Animais de Laboratório
criação e experimentação

Animais de Laboratório
criação e experimentação

Antenor Andrade
Sergio Correia Pinto
Rosilene Santos de Oliveira
Organizadores

ISBN: 85-7541-015-6

Capa, projeto gráfico e editoração eletrônica
Angélica Mello

Copidesque e revisão
Cláudia Cristiane Lessa Dias
Janaina Souza Silva

Supervisão editorial
Marcionílio Cavalcanti de Paiva

Catalogação-na-fonte
Centro de Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca Lincoln de Freitas Filho

A598a Andrade, Antenor (org.)

Animais de Laboratório: criação e experimentação. / Organizado por Antenor Andrade, Sergio Correia Pinto e Rosilene Santos de Oliveira. – Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.

388p., il., tab., graf.

1. Animais de laboratório 2. Manuais de Laboratório [tipo de publicação] I. Pinto, Sergio Correia (org.) II. Oliveira, Rosilene Santos de (org.).

CDD - 20.ed. – 619

2002
Editora Fiocruz
Av. Brasil, 4036 – 1º andar – sala 112 – Manguinhos
21040-361 – Rio de Janeiro – RJ
Tels.: (21) 3882-9039 e 3882-9041
Telefax: (21) 3882-9007
e-mail: editora@fiocruz.br
http://www.fiocruz.br

A os bioteristas, que com seu senso ético,
profissionalismo e habilidade proporcionam conforto
e bem-estar aos animais de laboratório, contribuindo
significativamente para o desenvolvimento da pesquisa, do
ensino, da produção e do controle de imunobiológicos e
fármacos na área da ciência e tecnologia em saúde.

Autores

- **Alexandre de Oliveira Saisse**
  Biólogo, especialista em microbiologia veterinária, National Institutes of Health (EUA); chefe do Departamento de Controle da Qualidade Animal, Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fundação Oswaldo Cruz [saisse@fiocruz.br]

- **Ana Maria Aparecida Guaraldo**
  Bióloga, doutora em imunologia pela Universidade Estadual de Campinas; diretora do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas [guaraldo@cemib.unicamp.br]

- **Ana Maria Jansen**
  Médica-veterinária, doutora em microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; pesquisadora, chefe do Laboratório de Biologia e Tripanossomatídeos/Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz [jansen@ioc.fiocruz.br]

- **André Luiz Franco Sampaio**
  Biólogo, doutor em biologia celular e molecular pelo Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz; tecnologista do Laboratório de Farmacologia Aplicada/Fundação Oswaldo Cruz [asampaio@far.fiocruz.br]

- **André Luiz Rodrigues Roque**
  Médico-veterinário, bolsista do Departamento de Medicina Tropical/Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz [alrroque@yahoo.com.br]

- **Andréa Mendes Pereira**
  Médica-veterinária, tecnologista do Departamento de Produção Animal, Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fundação Oswaldo Cruz [andreamp@fiocruz.br]

- **Aníbal Rafael Melgarejo-Giménez**
  Biólogo, doutor em patologia experimental pela Universidade Federal Fluminense; pesquisador e chefe da Divisão de Animais Peçonhentos do Instituto Vital Brazil [anibalmg@provide.psi.br]

- **Antenor Andrade**
  Médico-veterinário, especialista em zootecnia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; diretor do Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fundação Oswaldo Cruz [ande@fiocruz.br]

- **Belmira Ferreira dos Santos**
  Médica-veterinária, especialista em produção de animais consangüíneos e não-consangüíneos pelo The Jackson Laboratory (EUA); tecnologista do Departamento de Produção Animal, Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fundação Oswaldo Cruz [bel@fiocruz.br]

• Bernardo Rodrigues Teixeira
Biólogo, bolsista do Departamento de Medicina Tropical/Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz [bernardo@biologo.com.br]

• Celia Virginia Pereira Cardoso
Médica-veterinária, especialista em ciência de animais de laboratório pela Universidade de São Paulo; vice-diretora do Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fundação Oswaldo Cruz [cardoso@fiocruz.br]

• Delma Pegolo Alves
Bióloga, mestre em ciências biológicas pela Universidade Estadual de Campinas; responsável técnica pelas áreas de matrizes, produção e expedição de animais, Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas [delma@cemib.unicamp.br]

• Ekaterina Akimovna B. Rivera
Médica-veterinária, mestre em ciência de animais de laboratório pela University of London (Reino Unido); coordenadora do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás [e.rivera@uol.com.br]

• Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay
Física, doutora em biofísica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; professora-adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro [abdelhay@biof.ufrj.br]

• Leda Maria Silva Kimura
Médica-veterinária, mestre em microbiologia veterinária pela Universidade Federal Rural do Estado do Rio de Janeiro; pesquisadora responsável pelas áreas de virologia e biotério, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro [lba@domain.com.br]

• Luiz Afonso Pires
Biólogo, Laboratório de Criobiologia da Universidade Estadual de Campinas [afonso@cemib.unicamp.br]

• Luiz Augusto Corrêa Passos
Biólogo, mestre em imunologia pela Universidade Estadual de Campinas; responsável pelos Laboratórios de Controle da Qualidade, Genética e Criopreservação da Universidade Estadual de Campinas [passos@cemib.unicamp.br]

• Marcia Agostini
Socióloga, mestre em psicossociologia das comunidades e ecologia social pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; pesquisadora e vice-coordenadora de ensino do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana, Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz [agostini@ensp.fiocruz.br]

• Márcia Cristina Ribeiro Andrade
Médica-veterinária, mestre em ciência em biologia parasitária pelo Instituto Oswaldo Cruz; tecnologista do Departamento de Primatologia, Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fundação Oswaldo Cruz [andrade@fiocruz.br]

• Marcos Antônio Pereira Marques
Biólogo, mestre em ciência em microbiologia veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; tecnologista do departamento de Controle da Qualidade Animal, Centro de Criação de Animais de Laboratório/ Fundação Oswaldo Cruz [marques@fiocruz.br]

• Marcos Zanfolin
Biólogo, responsável pelas seções de Fundação e Expansão de Matrizes de Camundongos e Ratos, Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, Universidade Estadual de Campinas [zanfolin@biot.fm.usp.br]

• Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques
Bióloga, doutora em biologia celular e molecular, área de farmacologia, pelo Instituto Oswaldo Cruz; pesquisadora-titular, chefe do Laboratório de Farmacologia Aplicada e diretora de Pesquisa do Instituto de Tecnologia em Fármacos/Fundação Oswaldo Cruz [gracahen@far.fiocruz.br]

• Octavio Augusto França Presgrave
Biólogo, tecnologista do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz [octavio@alpha.incqs.fiocruz.br]

• Paulo Guilherme da Silva Sá
Médico-veterinário, doutor em toxicologia ambiental pela Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz; pesquisador-visitante, Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz [pgsa@brfree.com.br]

• Paulo Sergio D'Andrea
Biólogo, mestre em zoologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; pesquisador-adjunto, vice-chefe do Laboratório de Biologia e Controle da Esquistossomose, Departamento de Medicina Tropical/Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz [dandrea@ioc.fiocruz.br]

• Sebastião Enes Reis Couto
Médico-veterinário, especialista em planejamento e produção de animais de laboratório – gnotobióticos e SPF – pelo National Institutes of Health (EUA); chefe do Departamento de Produção Animal, Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fundação Oswaldo Cruz [scouto@fiocruz.br]

• Thiago Henrique Cimadon Dini
Biólogo, Laboratório de Criopreservação de Embriões, Universidade Estadual de Campinas [dini@cemib.unicamp.br]

• Thiago Marinho Santana
Biólogo, Laboratório de Criopreservação de Embriões, Universidade Estadual de Campinas [santana@cemib.unicamp.br]

Organizadores

• Antenor Andrade
Médico-veterinário, especialista em zootecnia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; diretor do Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fundação Oswaldo Cruz [ande@fiocruz.br]

• Sergio Correia Pinto
Administrador, responsável pelas áreas de informática, planejamento e orçamento do Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fundação Oswaldo Cruz [spinto@fiocruz.br]

• Rosilene Santos de Oliveira
Administradora, coordenadora de ensino do Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fundação Oswaldo Cruz [rosilene@fiocruz.br]

Sumário

Prefácio

A contínua evolução do conhecimento humano, especialmente o da biologia, bem como das medicinas humana e veterinária, repercute no desenvolvimento de ações envolvendo a criação e a experimentação animal, desencadeando uma constante e necessária atualização de suas técnicas e procedimentos.

Há mais de um século, os animais de laboratório vêm sendo utilizados na pesquisa biomédica. A produção e o desenvolvimento de vacinas e de anticorpos monoclonais; a avaliação e o controle de produtos biológicos; os estudos de farmacologia e toxicologia; os estudos da bacteriologia, virologia e parasitologia; os estudos de imunologia básica, de imunopatologia, de transplante e de drogas imunossupressoras etc. exigem o emprego de animais definidos genética e sanitariamente.

É incalculável o valor da contribuição dos animais de laboratório às novas descobertas para a prevenção de doenças e sua cura, bem como para o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento clínico e cirúrgico.

Os animais, como parte do processo de pesquisa, vêm contribuindo para o controle de mais de dez mil produtos farmacêuticos em uso corrente no mundo que, testados quanto à eficácia, à toxicidade, à potência e à esterilidade, resultam na sobrevida de muitos seres humanos.

As técnicas atuais de engenharia genética e biologia molecular abriram muitos caminhos para a criação e a produção desses animais. A área dos transplantes de órgãos e tecidos é cada dia mais impulsionada, bem como a área de produção de derivados biológicos para uso em humanos, a partir da obtenção de animais transgênicos, mutantes e *knockouts*.

Para fazer frente a todos esses avanços, é necessário também não perder de vista a qualidade da formação do pessoal técnico envolvido em cada uma dessas áreas. Nesse sentido, o Centro de Criação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ elaborou este livro, com base no conteúdo programático do curso internacional Criação e Produção de Animais de Laboratório, realizado em 2001.

Este livro traz uma contribuição muito importante, apresentando ao leitor os diversos aspectos do bioterismo, exatamente no momento em que se verifica uma profunda mudança nos padrões das pesquisas realizadas em nosso país.

Na ocasião do seu lançamento, a presidência da FIOCRUZ cumprimenta a equipe que participou da elaboração e execução deste projeto, reconhecendo como uma conseqüência do esforço e da dedicação ao longo de vários anos.

Paulo Marchiori Buss
Presidente da FIOCRUZ

A presentação

A necessidade de um programa de treinamento em técnicas aplicadas à ciência em animais de laboratório é evidente, em virtude dessa carência nos cursos formais de nossos estabelecimentos de ensino.

As diferentes espécies de animais empregadas no controle da qualidade de produtos para a saúde e nas atividades de pesquisa, bem como as diferentes linhagens genéticas, precisam ser estudadas e aprofundadas. O mesmo ocorre com os controles sanitário e genético desses animais e com os modernos conceitos de manejo empregados na criação e produção de animais sanitária e geneticamente definidos.

Esse programa abrange as áreas diretamente envolvidas com a criação, produção e manutenção de animais de laboratório, que se destinam às pesquisas biomédicas voltadas à saúde pública.

É com imensa satisfação que apresentamos à comunidade este livro, composto pelos temas discutidos em aulas teóricas, práticas e em visitas técnicas realizadas durante um mês de curso para profissionais que desenvolvem atividades em biotério de criação ou de experimentação animal.

Os assuntos aqui abordados proporcionarão aos bioteristas e a outros profissionais, que utilizam animais de laboratório, conhecimento das técnicas e necessidades básicas no seu manejo, considerando principalmente a biossegurança, o bem-estar e a ética com animais em todos os seus aspectos. Propiciarão, também, discussões sobre a aplicação e o uso tradicional dos animais de laboratório, buscando fortalecer a consciência quanto à necessidade de racionalizar os experimentos que envolvem animais, evitando assim a sua utilização desnecessária e substituindo-a, sempre que possível, por técnicas alternativas.

Esta publicação vem ao encontro da necessidade de aperfeiçoamento e fortalecimento, cada vez mais exigidos na ciência e tecnologia em saúde, e das ações voltadas para o desenvolvimento de novos procedimentos com animais de laboratório.

Expressamos nossos agradecimentos à presidência da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pelo incentivo e apoio para a concretização deste projeto, tornando-o possível.

Aos orientadores e palestrantes – autores deste livro –, o nosso reconhecimento pela dedicação com que transmitiram seus conhecimentos, contribuindo para a divulgação da ciência em animais de laboratório.

Aos profissionais treinados por este projeto que, com a troca de conhecimentos e experiências, demostraram dedicação e interesse, contribuindo assim para o seu êxito.

Ao Departamento de Multimeios, ligado ao Centro de Informação Científica e Tecnológica (Cict/Fiocruz), por sua valiosa colaboração na reprodução deste material em forma de apostila, que veio a dar origem a este livro.

A todos os profissionais do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal/Fiocruz) que contribuíram para a realização deste projeto – na organização do curso, na coleta e ordenação dos assuntos didáticos, na aquisição de material de apoio e na orientação prática nas salas de animais – pela importante colaboração prestada.

Os Organizadores

O Bioterismo: evolução e importância

Antenor Andrade

Introdução

A contínua evolução do conhecimento humano, especialmente o da biologia, bem como das medicinas humana e veterinária, repercute no desenvolvimento de ações envolvendo a criação e experimentação animal, desencadeando a constante e necessária atualização de suas técnicas e procedimentos.

Por mais de um século, os animais de laboratório vêm sendo utilizados na pesquisa biomédica. Estudos de anatomia, fisiologia, imunologia e virologia, dentre outros, realizados em animais de laboratório, permitiram um avanço considerável no desenvolvimento da ciência e tecnologia.

Anteriormente, os animais de laboratório eram utilizados como simples 'instrumentos de trabalho' que ajudavam na investigação de diagnóstico e diferentes pesquisas sem se levar em conta sua qualidade genética e sanitária.

Em geral, os institutos de investigação eram responsáveis pela criação dos animais de laboratório, porém não possuíam estruturas adequadas e o pessoal não era habilitado para desenvolver essas atividades. Além disso, a inexistência de ração apropriada e a ausência de condições higiênicas nos criadouros não permitiam que fossem produzidos animais geneticamente definidos e com garantia sanitária. Dessa forma, para alguns, os animais de laboratório eram considerados como 'um mal necessário' e nessas circunstâncias, quando eram utilizados nas investigações e pesquisas, os resultados obtidos não eram confiáveis.

Atualmente, porém, os pesquisadores exigem que esses animais reúnam condições ideais, isto é, que atendam aos parâmetros de qualidade genética e sanitária, uma vez que nada mais são que 'reagentes biológicos' e os resultados dos experimentos são afetados em razão da qualidade de cada espécie utilizada. Assim, para garantir a confiabilidade do experimento, animais 'definidos' devem ser usados.

Animais de laboratório definidos são aqueles criados e produzidos sob condições ideais e mantidos em um ambiente controlado, com conhecimento e acompanhamento microbiológico e genético seguros, obtidos por monitoração regular. Os chamados animais de laboratório convencionais podem satisfazer as exigências da experimentação biológica, ao passo que animais obtidos na natureza não as satisfazem, pois não são submetidos a nenhum tipo de controle.

Tais exigências levaram nossos antecessores à busca de solução para essa problemática e, assim, criou-se uma autêntica especialidade – 'A Ciência em Animais de Laboratório'. Esta tem tido grande desenvolvimento nos últimos anos, alcançando níveis muito elevados em vários países como: Estados Unidos da América, Alemanha, Inglaterra, Japão, Holanda e França.

Histórico

A utilização de animais de laboratório em investigação biológica teve, inicialmente, estreita relação com a 'patologia comparada'. Na época, como as autópsias em cadáveres humanos estavam proibidas, os cientistas procuravam nos animais a origem e as características dos processos patológicos que afetavam a espécie humana, fazendo necropsias nesses animais para deduzir semelhanças.

Cientistas como Aristóteles, Galeno, Hipócrates, entre outros, estudaram as semelhanças e diferenças entre os órgãos dos animais e do homem, interpretaram fenômenos biológicos, descobriram o funcionamento de órgãos, estudaram a circulação sangüínea, a respiração, a nutrição e os processos de digestão, utilizando várias espécies de animais. Isso ocorreu alguns anos antes de Cristo e foi o começo do uso de animais de laboratório, que contribuíram sobremaneira para o desenvolvimento da ciência.

Mais tarde, com os estudos da bacteriologia, a utilização de animais de laboratório tornou-se mais necessária ainda. Assim, desde os primeiros trabalhos de Pasteur e Koch, já no século XVIII, coelhos, cobaias, ratos, camundongos e *hamsters* passaram a ser 'ferramenta de trabalho' dos pesquisadores, imprescindível para identificar os germes causadores das enfermidades contagiosas. Sem a experimentação nesses animais, não teriam sido produzidas as primeiras vacinas contra o carbúnculo e contra a raiva.

Analisando-se historicamente, observa-se que o Brasil apresentava, até a década de 70 do século passado, uma situação precária em matéria de instalações e cuidados na produção de animais em condições de utilização em trabalhos experimentais. Todavia, o esforço exercido por algumas instituições oficiais, no sentido de construir biotérios em condições adequadas, dotados de barreiras físicas contra a propagação de infecções, com sistema de climatização apropriado, tem mudado esse quadro, constituindo grande avanço. Algumas delas, inclusive, já produzem animais SPF (livres de germes patogênicos específicos), gnotobióticos (flora conhecida) e *germfree* (livres de germes).

O considerável progresso alcançado nos últimos 30 anos, nessa área, exige o treinamento de profissionais de nível superior na especialidade 'Animais de Laboratório', bem como a capacitação de técnicos que desenvolvem suas atividades em biotérios de criação e de experimentação.

Na maioria dos países, a produção e padronização dos animais de laboratório mais utilizados em pesquisa encontram-se em pleno aperfeiçoamento. Tudo converge para a aquisição de modelos genéticos – ecológica e sanitariamente definidos – solicitados para a realização dos trabalhos dos pesquisadores.

As técnicas atuais de engenharia genética e de biologia molecular abriram muitos caminhos para a criação e produção desses animais. A área dos transplantes de órgãos e tecidos é cada dia mais impulsionada, bem como a de produção de derivados biológicos para uso em humanos com base na obtenção de animais transgênicos. O controle das doenças hereditárias também se desenvolve à proporção que os dias passam.

A evolução vertiginosa da Ciência & Tecnologia alerta para a necessidade urgente da implantação de um sistema moderno e ágil – por que não dizer, de vanguarda –, em biotérios, que permita a troca eficiente entre os avanços das pesquisas, incluindo a tendência atual da criação de métodos alternativos que venham a minorar a aplicação e o uso tradicional dos animais de laboratório.

Importância

É incalculável o valor da contribuição dos animais de laboratório às novas descobertas para a prevenção de doenças e para a sua cura, bem como para o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento cirúrgico. Esse reagente biológico é fundamental como modelo no estudo de doenças ainda incuráveis – como muitos cânceres, a Aids e a esclerose múltipla. Contribui ainda para o controle de mais de dez mil produtos

farmacêuticos em uso corrente no mundo e que, testados quanto à eficácia, esterilidade, toxicidade e potência resultam na sobrevida de muitos pacientes.

Atualmente o animal de laboratório é prioritário no campo da experimentação, e os centros de produção desses animais têm uma grande preocupação com sua produção e manejo.

Para assegurar a produção de animais de laboratório, na qualidade que satisfaça os requisitos para o uso nas pesquisas médicas, são necessárias instalações apropriadas, equipamentos especializados e pessoal habilitado, sem o que não conseguiremos obter adequadamente este 'reagente'.

Esses animais representam modelos adequados e, portanto, necessários ao estudo de diferentes modalidades da biologia e medicina experimentais. Assim, o desenvolvimento da biotecnologia depende da utilização desses animais que necessariamente terão de ser 'limpos' para que não haja interferência nos resultados das pesquisas.

A produção e o desenvolvimento de vacinas e de anticorpos monoclonais, a avaliação e o controle de produtos biológicos, os estudos de farmacologia e toxicologia, estudos de bacteriologia, virologia e parasitologia, estudos de imunologia básica, de imunopatologia, de transplantes e de drogas imunossupressoras etc., exigem o emprego de animais definidos genética e sanitariamente.

Pelas razões descritas anteriormente e pela necessidade das experimentações serem realizadas em animais antes que qualquer produto seja aplicado ao homem – uma vez que este não pode ser transformado em cobaia e considerando, ainda, que a essência de nosso trabalho é salvar vidas humanas mediante a produção desses animais e sua posterior utilização –, o bioterismo assume um papel de suma importância e deve ser encarado com total responsabilidade tanto por parte daqueles que desenvolvem tais atividades quanto por parte de nossos dirigentes.

Definição

Um biotério nada mais é que uma instalação dotada de características próprias, que atende às exigências dos animais onde são criados ou mantidos, proporcionando-lhes bem-estar e saúde para que possam se desenvolver e reproduzir, bem como para responder satisfatoriamente aos testes neles realizados.

Necessidades Básicas de um Biotério

Instalações – devem ser específicas para esse fim, porque somente assim conseguiremos condições ideais para a produção e manutenção desses animais.

Equipamentos – dada a especificidade do trabalho, necessário se faz que tenhamos máquinas especiais para a obtenção dos resultados desejados (máquinas de lavar gaiolas, autoclaves etc.).

Modelo animal – criar o animal desejado, de acordo com as pesquisas e os testes a serem realizados.

O pesquisador biomédico trabalha com modelos animais que, necessariamente, diferem do homem. Entretanto, tais modelos podem ser comparados com o homem, baseados, principalmente, no que consiste em uma semelhança geral sob o aspecto de caracteres anatômicos e fisiológicos.

Necessário se faz, portanto, que sejam produzidos animais que, quando inoculados com uma determinada substância, apresentem reações semelhantes às do homem.

Dessa forma, os animais criados para esse fim deverão possuir as seguintes características:

• fácil manejo;
• prolificidade;
• docilidade;

- pequeno porte;
- baixo consumo alimentar;
- fisiologia conhecida;
- ciclo reprodutivo curto.

Rotinas e procedimentos – devem ser adotadas rotinas diárias para que se possa cumprir um programa de produção, de controle ou de pesquisa. Os procedimentos operacionais dos equipamentos devem ser rigorosamente observados para sua melhor utilização e para a segurança do operador.

Pessoal – as atividades desenvolvidas em um biotério exigem pessoal qualificado para que se possa obter bons resultados. Além de pessoal capacitado, bem treinado e que goste de animais, o bioterista deve possuir alguns requisitos, como:

- saúde – deve ser controlada, periodicamente, para evitar a transmissão de doenças aos animais. A periodicidade desse controle depende do tipo de biotério e das condições particulares de cada instituição;
- disciplina – para que possa cumprir com acerto todas as tarefas e determinações, o bioterista deve possuir autocontrole e disciplina;
- temperamento calmo – o bioterista, ao executar suas atividades, deve ser tranqüilo nas ações, a fim de evitar o estresse dos animais;
- responsabilidade – para que possa desenvolver seu trabalho sem causar nenhum prejuízo aos animais, o bioterista deve ter responsabilidade suficiente para não deixar, sob hipótese nenhuma, de executar suas tarefas, principalmente quando se trata de alimentação dos animais;
- respeito para com o animal – o animal deve ser respeitado como um ser vivo, que sente dor, fome, sede e medo, para que possa ter assegurada a sua sobrevivência;
- cuidado com o material – o material é caro e de difícil aquisição, além de ser indispensável para a execução do trabalho. Assim, deve-se ter o máximo de cuidado com ele, a fim de se preservá-lo e tê-lo sempre à disposição;
- gostar do que faz – é outro importante requisito que o bioterista deve possuir, porque fazemos sempre melhor tudo aquilo que prazerosamente executamos.

Bibliografia

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.

Saiz Moreno, L.; Garcia de Osma, J. L. & Compaire Fernandez, C. *Animales de Laboratório: producción, manejo y control sanitario*. Madrid: Instituto National de Investigações Agrarias/Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1983.

Stephens, U. K. & Patton, N. M. (Eds.). *Manual for Laboratory Animal Technicians*. USA: Ed. The American Association for Laboratory Animal Science, 1984.

Universities Federation for Animal Welfore (Ufaw) *The Ufaw Handbook on The Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. London/New York: Churcill Livingstone, 1986.

2

Modelo Animal

Belmira Ferreira dos Santos

Definição

Em primeiro lugar, definiríamos modelo como algo que permite imitação ou reprodução. O próximo passo é associar animal e modelo. O que seria um modelo animal?

Histórico

Desde a mais remota Antigüidade, o homem, levado pela curiosidade, tem tentado desvendar os mistérios do ambiente que o cerca. Nas ciências biológicas o mesmo aconteceu. Os precursores da medicina adquiriram a maioria dos seus conhecimentos por meio da observação e utilização de animais como 'cobaias'. Por considerá-los seres inferiores, o homem os utilizava para ampliar os seus conhecimentos e realizar 'experiências' que de outra forma não seriam possíveis.

Com a expansão da espécie humana e de suas culturas pela Terra, o conhecimento científico se ampliou, passou a ser divulgado e 'escolas' começaram a surgir. Tais 'escolas' aceitavam alunos de outras partes do mundo, que depois retornavam a seus países de origem e lá continuavam a desenvolver e a disseminar os ensinamentos recebidos. É exatamente nesse ponto que a noção de modelo animal começou a tomar forma. Para que os experimentos pudessem ser reproduzidos e o trabalho continuasse, havia a necessidade de se utilizar o mesmo animal. Eis então que o conceito de modelo animal surgiu: era aquele animal que melhor respondia ao experimento e possibilitava a sua reprodução, de maneira que qualquer pesquisador pudesse ter acesso aos mesmos resultados. Em virtude desse novo conceito, cada vez mais espécies foram trazidas para os laboratórios, pois havia aquelas que forneciam respostas satisfatórias, as que não eram modelos tão bons e as que não sobreviviam ao cativeiro.

A pesquisa cresceu e se refinou. Com isso, os modelos usados tomaram o mesmo caminho. No princípio, bastava capturar animais ou consegui-los de criadores; quando esses morriam, era só repor o número perdido. Com o curso da experimentação, conhecimentos sobre os animais utilizados começaram a se fazer necessários e estes passaram a ser criados nos próprios laboratórios. O estudo de sua biologia e de seu comportamento corria paralelo ao experimento realizado.

Os biotérios nasceram da necessidade de se ter os animais em número, idade e sexos adequados ao estudo em andamento, além de facilitarem o alojamento, a manutenção e o transporte dos mesmos, já que, na maioria dos casos, a criação se dava no próprio laboratório de experimentação. Conforme a necessidade de aumentar a quantidade ou de diversificar as espécies de animais, houve a urgência de se separar os biotérios dos laboratórios de experimentação para que cada atividade pudesse ser realizada de maneira mais adequada.

Com o estudo das diferentes espécies, o conhecimento sobre a sua biologia se expandiu e algumas começaram a ser mais utilizadas do que outras. Isso ocorreu graças a uma série de características inerentes aos

animais usados tais como: tamanho reduzido, ciclo reprodutivo curto, prole numerosa, precocidade, nutrição variada e adaptação ao cativeiro. Essas, entre outras, foram as características determinantes para a maior utilização de algumas espécies.

No início do século XX, a ciência tomou grande impulso e, com ela, a ciência de animais de laboratório começou a progredir.

Os roedores conquistaram um lugar de destaque, sendo os mais utilizados até hoje, pois atendem às características mencionadas antes e ainda apresentam outras, tais como: docilidade, fácil domesticação (= fácil manuseio), adaptação a ambientes variados e sociabilidade. Além destas, algumas foram adquiridas ou fixadas, ao longo da sua utilização, como o albinismo, que possibilita a marcação e visualização de experimentos realizados na pele. É preciso que se esclareça que o albinismo existe na natureza, mas o indivíduo portador é mais facilmente localizado pelos predadores naturais e dificilmente chega à idade reprodutiva, de forma que a característica não é passada à geração seguinte.

Conclusão

Pelo grande conhecimento acumulado sobre os roedores, sua manipulação genética foi um passo natural, e hoje, obedecendo ainda ao conceito de modelo animal, podemos dispor de animais muito mais adequados, já que seu genoma é resultante de acasalamentos dirigidos, os quais realçam determinadas características. O grau de sofisticação é tanto que se pode afirmar existir, para cada experimento realizado, um modelo cuja resposta é a mais adequada, e que esses modelos são facilmente encontrados, fazendo com que a pesquisa seja universalizada.

Ética na Experimentação Animal

Ekaterina Akimovna B. Rivera

Introdução

Ética é a ciência da moral e tem relação com o certo e o errado; é uma atitude cultural, crítica, sobre valores e posições de relevância no momento de atuar. Como cientistas, não falaremos da ética sob o ponto de vista filosófico, mas sim da ética prática ou utilitarista.

Desde o fim do século passado, o homem está procurando adotar um novo *ethos*, um novo tipo de comportamento e de ética perante a natureza. Ele é responsável pelos bens da terra, e como tal está buscando não explorá-los aleatoriamente, mas sim preservá-los para as gerações futuras. Cabe à lógica, e à ética que dela provém, a exploração do que a natureza nos oferece.

O homem também está repensando a ciência de um modo mais racional. Porém, não é fácil pensar racionalmente sobre ciência quando a mesma envolve o uso de animais. Nesse caso, há muita emoção envolvida. O tipo de atitude de cada pessoa com relação aos animais depende de vários fatores, muitos dos quais remontam ao início de nossas vidas. Também a atitude das pessoas com as quais temos contato nos influencia; o modo de elas agirem faz com que tenhamos uma atitude de sensibilidade ou não para com os animais.

Na ciência não é diferente. Assim como há cientistas que valorizam a vida animal, considerando-os seres sensíveis e procurando diminuir seus sofrimentos sempre que possível, há outros para os quais os animais têm o mesmo valor que um vidro de substância química usado em sua pesquisa.

Ética no Uso de Animais

A ciência viveu, por muito tempo, sob a influência filosófica de René Descartes. Este afirmava que os animais não tinham alma, eram autômatas e, portanto, incapazes de sentir ou de sofrer. Não há dúvida de que esse postulado era bastante conveniente para contestar qualquer alegação de crueldade nas pesquisas científicas. Entretanto, os próprios trabalhos científicos ajudaram a derrubar esse conceito.

Charles Darwin, que chocou muitas religiões com a sua teoria da evolução, da relação homem/primata, ajudou no processo de demonstrar que o homem é um animal e que, logo, as preocupações morais com o homem deveriam se estender aos animais.

Essa preocupação com a ética no uso de animais começou antes de Darwin e já vinha se manifestando. No início do século XIX, começaram a surgir movimentos que indicavam o desejo de mudar as atitudes que o homem tinha para com os animais, chegando mesmo a atingir altos graus de sentimentalismo, haja vista as pinturas de Landseer que mostravam cães velando o corpo de seus amos.

Na Inglaterra, durante a época vitoriana, vigorava um grande paradoxo em que se começou a supervalorizar a vida animal e desvalorizar a vida humana. Crianças faziam trabalho escravo em minas de carvão sem que

nenhuma atitude fosse tomada para acabar com isso, enquanto no Parlamento se tentava passar uma lei contra a crueldade para com animais, que posteriormente foi designada *The Cruelty to Animals*, 1875.

Nesse processo de supervalorização dos animais, os movimentos antiviviseccionistas tiveram importante papel. O que essas pessoas queriam era que a experimentação cirúrgica fosse feita somente com anestesia, o que era possível, já que as propriedades anestésicas do clorofórmio haviam sido descobertas. A primeira sociedade antiviviseccionista criada foi a Victoria Street Society, em Londres. Logo outras sociedades foram criadas, a Liga Alemã contra a Tortura Animal, em 1879; La Societé contre la Vivisection, em 1882 etc. Todas essas sociedades continuam ativas até hoje e sabem explorar a mídia em seu favor. O problema é que a maioria desses grupos é formada por fanáticos, com métodos muito agressivos, que aprimoram cada vez mais seus ataques. Porém, devemos reconhecer que tiveram importante papel, pois alertaram os cientistas de que algo deveria ser feito para proteger os animais da crueldade e evitar seu sofrimento.

Em 1926, Charles Hume fundou a sociedade University of London Animal Welfare (hoje, Universities Federation for Animal Welfare), numa tentativa de fazer com que os cientistas pensassem racionalmente sobre suas atitudes para com os animais. E no meio da briga em que se posicionavam cientistas *versus* antiviviseccionistas, estes a colocar o bem-estar animal em situação ridícula, Hume (apud Rempry, 1987) disse: "o que o bem-estar animal precisa é de pessoas educadas com cabeças frias e corações quentes preparados para ver o sofrimento dos animais e procurando meios práticos de aliviá-los".

Em colaboração com outros cientistas, Hume publicou a primeira edição *do Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, em 1947, mostrando assim a preocupação, cientificamente embasada, com o bem-estar animal.

É um axioma o fato de que necessitamos dos animais, seja para pesquisas, trabalhos, diversão, companhia, alimentação. O homem, como animal superior, considera-se no direito de usar os outros animais, porém esse 'direito de usar é inseparável do dever de não abusar desse direito'.

E os Animais, têm Direitos ou Não ?

Há posições extremas como a de Reagan, em 1976, o qual considera que qualquer associação homem/animal não é de interesse para o mesmo, sendo, portanto, exploradora. Essa posição não é aceita pela maioria dos filósofos. Nessa questão do direito dos animais, há não só diferenças de opiniões como também diferenças devido aos sistemas legais dos países, e nessa área de atuação há dois deles que detêm maior influência no assunto – os Estados Unidos e o Reino Unido.

Nos Estados Unidos, o propósito da lei é visto como a proteção dos direitos. Como existem leis para proteger os animais, mesmo contra seus proprietários, resulta que os animais gozam de direitos. Em teoria, as leis podem proteger a vida de um animal, com base em que estes têm o direito de realizar seus propósitos naturais. Atualmente, porém, tais leis protegem os animais dos maus-tratos abusivos, de crueldades e de sofrimentos, não reivindicando outros direitos.

Na Grã-Bretanha, as leis de proteção animal não são vistas como conferindo direitos aos animais, mas sim colocando deveres ao homem. As pessoas adultas capazes de responder por si mesmas possuem direitos legais, porque se presume que estas têm responsabilidade moral por seus atos. Nesse caso, os adultos teriam responsabilidade não só por si mesmos, mas também para com crianças, deficientes e idosos incapazes de responder por seus atos. Dentro da lógica desse pensamento, o homem tem deveres e não direitos sobre os animais. Esses deveres podem ser especificados e sustentados por lei, o que não implica que os animais tenham direitos próprios. E podemos citar o 'princípio de reverência' pela vida, preconizando que o homem deve proteger e cuidar de suas criaturas amigas, os animais.

Como cuidar de nossos animais no caso de experimentação, já que sabemos que muitas vezes essa atividade é decisiva para o conhecimento de fenômenos vitais, e que forçosamente teremos de utilizá-los?

A experimentação animal é uma atividade humana com grande conteúdo ético. Os problemas éticos da experimentação animal surgem do conflito entre as justificativas para o uso de animais em benefício de si próprios e do homem e o ato de não causar dor e sofrimento aos animais. Esse conflito é inevitável, e só pode ser tratado equilibrando-se os valores opostos. Quanto maior o sofrimento que um experimento irá causar aos animais, mais difícil é a sua justificativa. Não é nada fácil tomar decisões éticas.

Podemos considerar como legitimamente éticos os experimentos em animais que sejam de benefício direto para a vida e para a saúde humana e animal. Também podem ser considerados como éticos, mesmo não sendo benefícios diretos, os que procuram novo saber que contribua significativamente para o conhecimento da estrutura, função e comportamento dos seres vivos.

Os experimentos com animais não são eticamente válidos se houver métodos alternativos fidedignos para o conhecimento que se procura.

O princípio ético de reverência pela vida exige que se obtenha um 'ganho' maior de conhecimento com um 'custo' menor no número de animais utilizados e com o menor sofrimento dos mesmos.

O Princípio dos 3 Rs

Dois cientistas ingleses, Russell & Burch (apud Remfry, 1987), conseguiram sintetizar com três palavras o Princípio Humanitário da Experimentação Animal. Por sua grafia em inglês conter a letra R no início de cada palavra – *Replacement*, *Reduction* e *Refinement* –, ficou definido como o Princípio dos 3 Rs.

Replacement – traduzido como Alternativas, indica que sempre que possível devemos usar, no lugar de animais vivos, materiais sem sensibilidade, como cultura de tecidos ou modelos em computador. Os mamíferos devem ser substituídos por animais com sistema nervoso menos desenvolvido. O Fundo para Alternativas ao Uso de Animais em Experimentação (Frame, sigla original em inglês), fundado em 1969, no Reino Unido, procura encontrar novas técnicas para a substituição dos animais em pesquisas. Já surgiram várias alternativas como, por exemplo, culturas de tecidos humanos para a produção de vacinas da pólio e da raiva e testes *in vitro* para testar a segurança de produtos. Porém, há inúmeras áreas onde não é possível usar alternativas como pesquisa de comportamento, da dor, cirurgia experimental, ação de drogas etc.

Reduction – traduzido como Redução; já que devemos usar animais em certos tipos de experimentos, o número utilizado deverá ser o menor possível, desde que nos forneça resultados estatísticos significativos. Atualmente, o número de animais usados em experimentação diminuiu porque utilizam-se animais com estado sanitário e genético conhecidos, bem como são feitos o delineamento experimental e a análise estatística antes de se iniciar a pesquisa ou teste. Os cursos ministrados sobre animais de laboratório contribuíram enormemente para a redução no número de animais utilizados, pois ensinam como usar o menor número possível deles.

Refinement – traduzido como Aprimoramento, refere-se a técnicas menos invasivas, ao manejo de animais somente por pessoas treinadas, pois uma simples injeção pode causar muita dor quando dada por pessoa inexperiente.

Estamos ainda longe de atingir os 3 Rs. As farmacopéias estão cheias de anomalias sobre o uso de animais empregados em testes. Exemplificando, se para um teste de insulina são suficientes 12 coelhos, porque ainda se utilizam 96 camundongos? Porque são mais baratos ou serão os camundongos menos sensíveis?

Atualmente, a maioria dos cientistas envolvidos com experimentação animal possui respeito pela vida e se preocupa em conduzir suas pesquisas sem causar dor e sofrimento aos animais, seguindo os princípios éticos da experimentação animal. Sabemos que não é fácil policiar a pesquisa, pois esta é realizada em laboratórios fechados e pode-se dizer que o uso ético de animais depende muito da 'integridade e consciência de cada cientista'.

Conclusão

Falamos sobre a questão ética da experimentação animal e a inquietação de proporcionar-lhes bem-estar. Teríamos, então, condições de sensibilizar nossos colegas cientistas e todas as pessoas que trabalham com animais? Se isso for possível, como se concretizaria tal atitude?

Cremos que, em primeiro lugar, vem a 'educação', que pode ser adquirida por meio de palestras sobre ética, bem-estar, métodos alternativos, aprimoramento, intercâmbio de conhecimentos. Outra maneira de proporcionar educação é incorporar cursos de experimentação animal ao currículo de graduação e pós-graduação de medicina, medicina veterinária, ciências biológicas e áreas afins. É dever dos pesquisadores ensinar aos estudantes mais do que responder a uma pergunta científica. Precisamos ensiná-los a pensar na validade do experimento, fazê-los entender que seus trabalhos utilizam seres que possuem sensibilidade, sentem dor e medo também.

Aos cientistas, devemos lembrar-lhes que têm deveres específicos:

- responsabilidade pelo bem-estar geral dos animais – por isso devem conhecer muito bem a etologia e a biologia da espécie com que estão trabalhando – para poder proporcionar bom alojamento, manejo, alimento etc. aos seus animais. Também devem dar treinamento ao pessoal com quem irão trabalhar;
- calcular meios e fins – é esse experimento necessário? É relevante? Não será o mesmo uma repetição desnecessária? "*How much gain for how much pain*?";
- usar sempre os 3 Rs.

O empirismo da experimentação animal, inevitável quando dos albores da ciência, deve dar lugar a uma aproximação mais racional e, portanto, mais apropriada a uma ciência exata. Assim, não haverá conflito entre os apelos da ciência e a obrigação de humanidade para com os animais.

Referências Bibliográficas

Remfry, J. Ethical aspects of animal experimentation. In: *Laboratory Animals: an introduction for new experimenters*. New York: Ed. Tuffery, 1987.

Bibliografia

Academia Suíça de Ciências. Ethical principles and guidelines for scientific experiments in Switzerland. *Iclas Bulletin*, 53:9-15, 1983.

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to the Care and Use of Laboratory Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Howard-Jones, N. Cioms ethical code for animal experimentation. *Iclas Bulletin*, 57:29-36, 1986.

Rivera, E. A. B. Ética e bem-estar na experimentação animal. *Revista do Conselho Federal Medicina Veterinária*, 1(1):12-15, 1992.

Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1986.

4

Classificação de Biotérios quanto à Finalidade

Celia Virginia Pereira Cardoso

Introdução

Os biotérios podem ser classificados por três critérios diferentes:

- quanto à finalidade a que se destinam;
- quanto à existência ou não de uma rotina de controle microbiológico (condição sanitária);
- quanto à rotina existente de métodos de acasalamento dos animais (condição genética).

Este capítulo é destinado ao primeiro critério acima citado, enquanto os demais serão tratados nos capítulos 8 e 9 deste livro.

Quanto à Finalidade a que se Destinam

Há três tipos de biotérios, segundo esta classificação:

- Biotério de Criação;
- Biotério de Manutenção;
- Biotério de Experimentação.

Biotério de Criação

Quando submetemos diversos animais a um determinado experimento, esperamos obter deles 'respostas as mais parecidas possíveis', de modo que possamos comparar os resultados com a hipótese feita anteriormente. Para que os animais possam dar respostas similares, deveremos, por conseguinte, procurar controlar todas as variáveis que esses animais possam ter.

Assim, um biotério de criação é aquele onde se encontram as matrizes reprodutoras das diversas espécies animais que originam toda a produção e cujos objetivos visam a controlar e definir, antes do experimento, as seguintes características:

- o estado de saúde do animal;
- sua carga genética;
- o manuseio feito com o animal de modo a torná-lo dócil;
- a alimentação empregada;
- o ambiente adequado;
- outros fatores que possam ocasionar estresse, influenciando, assim, indiretamente, na resposta esperada.

Para que todos esses objetivos sejam atingidos, um biotério de criação necessita de uma edificação especialmente construída para tal fim, pessoal capacitado e uma rotina de trabalho bem definida.

Certamente, essas medidas adotadas determinarão um biotério de qualidade, com baixo índice de transmissão de doenças e, conseqüentemente, baixa mortalidade.

O grande problema enfrentado pelas diversas instituições científicas é o alto custo que representa a construção e a manutenção desse tipo de biotério. Porém, devemos lembrar que a precisão e a confiabilidade nos resultados de pesquisas ou produtos que incidem sobre a saúde de uma população não têm preço.

Biotério de Manutenção

Este tipo de biotério tem duas finalidades específicas:

Adaptação do animal ao cativeiro

Nesse caso, o animal utilizado provém de fontes externas, tais como:

natureza – os exemplos mais comuns são os macacos e tatus que são capturados diretamente na floresta.
granjas conhecidas – geralmente, as aves e animais de médio e grande portes são adquiridos dessa forma.
rua – os casos mais clássicos são representados pela aquisição de cães e gatos.

Todos esses animais devem passar por um período de aclimatação para depois serem utilizados. Essa aclimatação visará a adaptar o animal ao ambiente de laboratório, à alimentação empregada, ao manuseio utilizado e ao controle de possíveis doenças (quarentena).

Produção de sangue animal e fornecimento de órgãos

Esta finalidade é muito importante, visto sua necessidade na produção de meios de cultura, fixação de complemento, desenvolvimento de técnicas cirúrgicas em transplantes e em outras práticas biomédicas.

Considerando que o sangue deve ser proveniente de animais sadios, alguns biotérios mantêm, principalmente, os médios e grandes animais para esse fim. No entanto, pequenos animais, como o coelho por exemplo, podem ser utilizados.

Ao contrário do biotério de criação, o biotério de manutenção tem um custo menor na aquisição e/ou manutenção de animais, sendo recomendado, especialmente, no caso em que é necessária a conservação de espécies que não são utilizadas com freqüência.

Esse tipo de biotério pode fazer parte de um biotério de experimentação sem necessitar de uma instalação em separado.

Os principais problemas advindos dos animais mantidos nessas instalações são: o risco de perdas acentuadas devido ao transporte e/ou à má adaptação; características não definidas quanto ao estado de saúde; desconhecimento do *background* genético, ou seja, das características genéticas dos antecessores da espécie e/ou cepa ali mantida e risco de transmissão de doenças ao ser humano, como por exemplo, a raiva, as encefalomielites etc.

Biotério de Experimentação

Para que o experimento feito no animal tenha o resultado esperado, é necessário controlar, ao máximo, os fatores que possam interferir, direta ou indiretamente, e só fazer variar aquelas características que se quer estudar.

Assim, em um biotério de experimentação se procura padronizar o ambiente, a alimentação e o manejo de acordo com as normas dadas pelo experimento.

Tal como o biotério de criação, o biotério de experimentação deve possuir uma edificação especialmente projetada, pessoal capacitado e uma rotina de trabalho bem definida, porém, neste caso, adaptada ao experimento.

Quando se tratar de estudos de doenças potencialmente transmissíveis ao homem (zoonoses), a estrutura desse biotério, bem como a rotina de trabalho terão de, obrigatoriamente, oferecer barreiras à transmissão de doenças para o funcionário que trabalha no local.

Recomendações

- Nunca um biotério de experimentação poderá estar anexado ao biotério de criação, pois o primeiro representa um enorme risco de contaminação para o segundo.
- O biotério de criação deverá estar sempre em uma situação independente quanto à estrutura física, pessoal e material, em relação aos demais laboratórios da instituição, a fim de provê-lo de maior segurança e menor risco de contaminações indesejáveis.
- Qualquer animal que entrar em um biotério de criação deverá passar por um período de quarentena. Do mesmo modo, animais que chegam ao biotério de experimentação terão de passar por um pequeno período de aclimatação antes de serem utilizados.

Bibliografia

Saiz Moreno, L.; Garcia de Osma, J. L. & Compaire Fernandez, C. *Animales de Laboratório: producción, manejo y control sanitario*. Madrid: Instituto National de Investigações Agrarias/Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1983.

Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 5th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1976.

5

Instalações e Barreiras Sanitárias

Sebastião Enes Reis Couto

Introdução

Para criar ou manter animais de laboratório é necessário que tenhamos instalações adequadas, uma vez que suas necessidades básicas deverão ser atendidas, para que possam sobreviver e tenham assegurado seu desenvolvimento fisiológico.

Assim, tais instalações devem possuir temperatura, umidade, ventilação e pressão de acordo com as exigências de cada espécie a ser criada ou mantida, e de acordo com a finalidade do biotério.

Instalações

As instalações de um biotério devem ser projetadas de forma a atender às recomendações para a criação e/ou manutenção de animais, bem como às necessidades particulares de cada instituição.

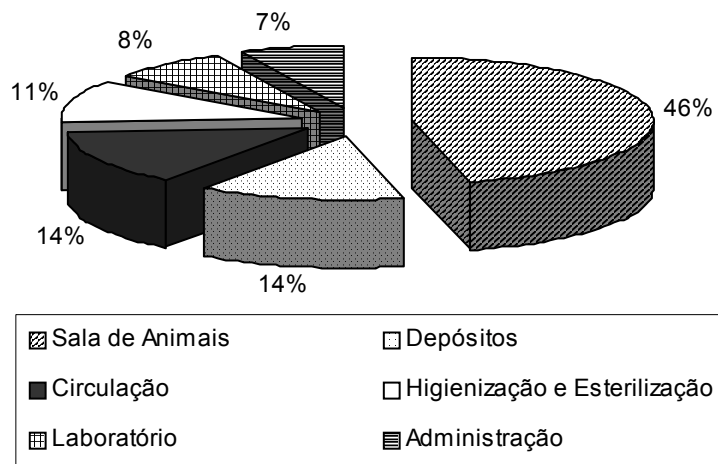
Na escolha do local para a construção de um biotério, devemos levar em consideração os seguintes aspectos:

- não devem haver fontes poluidoras nas proximidades (aerossóis, ruídos etc.);
- a área deve permitir ampliação das instalações e modernização dos equipamentos.

Uma instalação moderna deve ser constituída por um edifício reservado para a criação animal e/ou experimentação, com total independência de suas áreas. Além disso, deve ter tamanho suficiente para assegurar que não haja criação/manutenção de espécies diferentes em um mesmo ambiente.

Como regra geral, recomendamos a seguinte distribuição de áreas:

- 46% para sala de animais e quarentena;
- 14% para circulação (corredores);
- 14% para depósitos (alimentos, materiais e insumos);
- 11% para higienização e esterilização;
- 8 % para laboratório;
- 7% para administração.

Figura 1 – Distribuição das áreas de um biotério

Estrutura Física

A estrutura física deve possuir três elementos básicos: salas de animais, corredor de distribuição e corredor de recolhimento. As salas de animais devem estar compreendidas entre os dois corredores.

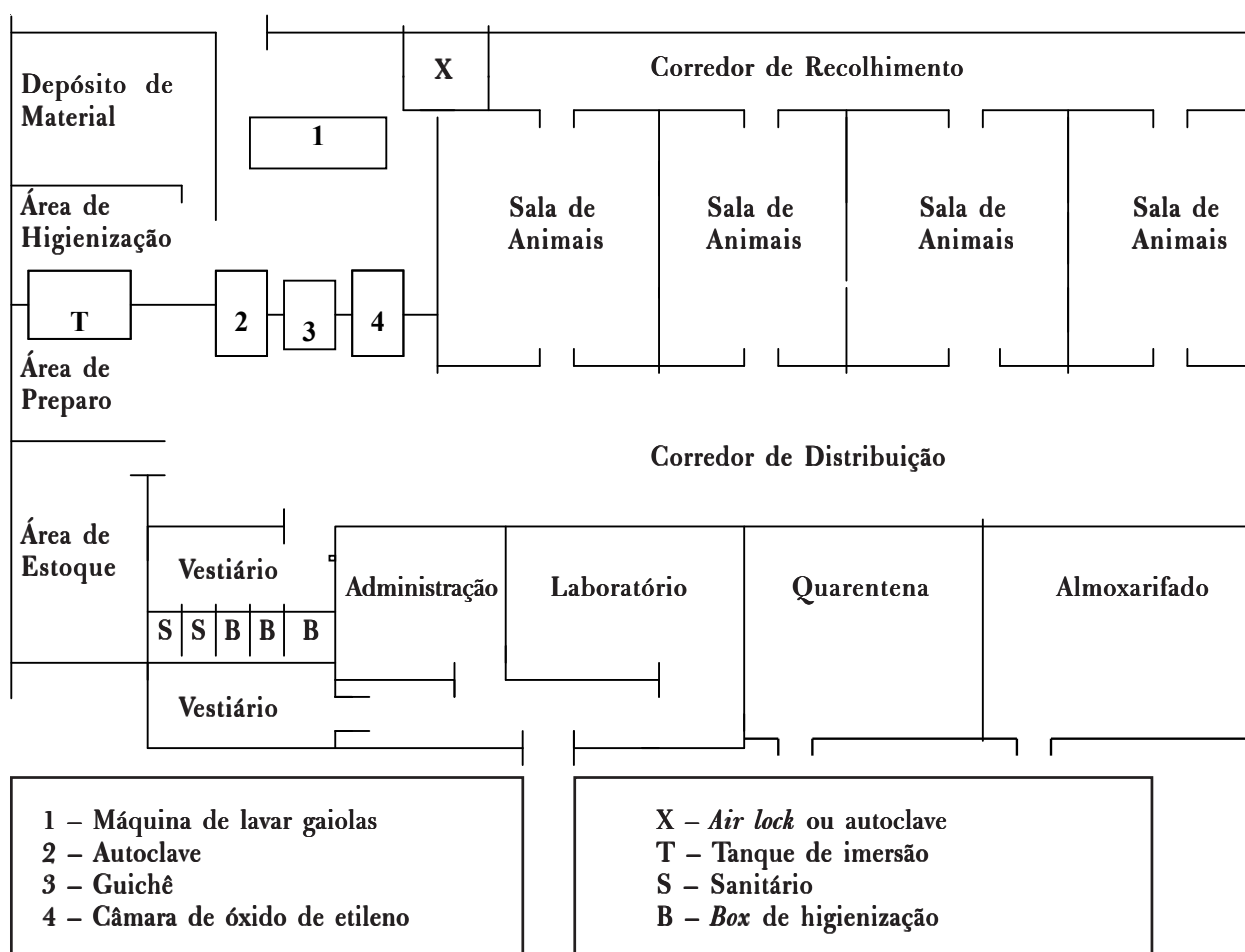
O fluxo de acesso e retorno das salas de animais, efetuado por corredores independentes, permite diferenciar duas áreas distintas:

- aquela destinada ao preparo do material a ser enviado para as salas de animais, incluindo o corredor de distribuição, denominada área de preparo/corredor de acesso ou de distribuição de materiais, ou simplesmente 'área limpa';
- o corredor de retorno das salas e a área destinada à higienização e esterilização de materiais provenientes das salas, denominada área de limpeza/corredor de retorno e/ou de recolhimento, ou simplesmente 'área suja'.

O fluxo de pessoal e de materiais deve ser feito no sentido unidirecional ('área limpa' para 'área suja').

Numa tentativa de aumento da área destinada aos animais, preconiza-se que mesmo biotérios de alto padrão sanitário podem operar com um corredor tanto para acesso e/ou distribuição quanto para retorno e/ou recolhimento. Todo o material a ser enviado para as salas de animais passa por autoclave de dupla porta e o material de retorno das salas sairia, também, pela autoclave.

Associado a esses ambientes são de fundamental importância, para uma boa operacionalização, a existência de um acesso independente para os bioteristas que trabalham na área de criação, uma área para materiais e insumos processados e uma área de higienização e desinfecção/esterilização com acesso próprio, bem como um depósito de materiais e insumos não processados.

Figura 2 – Estrutura física e equipamentos

Detalhes de Construção

OBS.: a seleção dos materiais a serem usados na construção do biotério é importante, à medida que podem propiciar condições adequadas e um funcionamento eficiente e higiênico, principalmente às áreas destinadas aos animais.

Piso – deve ser liso, altamente polido, porém não escorregadio, impermeável, não absorvente, resistente a agentes químicos (detergentes, desinfetantes, ácidos etc.). Exemplo: Korodu. Também deve suportar o peso dos equipamentos sem apresentar rachaduras ou deformações para que não permita o acúmulo de sujidade ou sirva de esconderijos para insetos.

Paredes – devem ser impermeáveis, lisas e sem fendas. Deve-se evitar que as juntas com o piso e o teto formem ângulos agudos, pois dificultam a limpeza. O revestimento (pintura) deve ser resistente a agentes químicos, bem como a lavagem tem de ser, preferencialmente, com água sob pressão. A adoção de medidas de proteção contra possíveis danos provenientes de carrinhos e equipamentos sobre rodízios é aconselhável. Se possível, devem ser tratadas acusticamente para se evitar a propagação de ruídos. Não é aconselhável o revestimento cerâmico (azulejos) em virtude das juntas.

Teto – deve ser de concreto plano, sem fundo falso, desfavorecendo a permanência de formas de vidas indesejáveis. O revestimento deve ser idêntico ao das paredes.

Janelas – nas salas de animais não deve haver janelas. Recomendamos visores equipados com dupla armação de vidro 4 mm, isolando o ambiente.

Portas – as portas e os marcos devem ser, de preferência, metálicos, ou de madeira revestidas de material lavável e resistente a agentes químicos. Devem se ajustar perfeitamente aos marcos, de forma a impedir a passagem de insetos e animais indesejáveis. É aconselhável que possuam visores para facilitar a visualização do ambiente, bem como dos corredores, sem que haja a necessidade de abri-las. Devem ter, no mínimo, 1 m de largura por 2 m de altura, a fim de facilitar a passagem de equipamentos e materiais.

Corredores – devem ser amplos, com no mínimo 1,5 m de largura, para favorecer o trânsito de materiais e equipamentos. As juntas piso/parede/teto devem ser arredondadas, a fim de facilitar a limpeza e desinfecção.

Sala de animais – devem ser em número suficiente para abrigar somente uma espécie por sala, isto é, numa sala deve ser criada ou mantida uma única espécie animal. A área recomendada é de 3 m de largura por 6 a 10 m de comprimento, considerando a espécie e o número de animais, bem como os materiais a serem utilizados.

Área de recepção – deve estar situada de forma que somente os animais que cheguem ao biotério tenham acesso, e que estes não necessitem passar por outras áreas.

Depósitos – as áreas de estocagem de rações peletizadas e de materiais utilizados como 'cama' (maravalha) devem ser ventiladas e secas, a fim de minimizar a proliferação de fungos e outras contaminações. Em se tratando de alimentos perecíveis (hortifrutigranjeiros), devem ser estocados separadamente das rações peletizadas e da maravalha, em ambiente adequado, em virtude da facilidade de deterioração, decomposição e conseqüente contaminação.

Área de higienização – esta área deve estar localizada de forma a não causar estresse aos animais e técnicos. A ventilação deve ser suficiente para evitar odores, excesso de calor e vapor, que podem afetar outras áreas. Autoclaves e outros equipamentos, como máquinas de lavar gaiolas, devem ser instalados nessa área. Deve haver separação entre ambientes 'limpo' e 'sujo'.

Laboratório de controle da qualidade – as atividades exercidas nesta área subdividem-se entre os laboratórios de parasitologia, microbiologia, micologia, virologia, patologia e genética, que podem estar localizados no próprio biotério ou pertencerem a laboratórios de apoio dentro ou fora dos institutos de pesquisa.

Instalações prediais – o acesso às instalações (hidráulica, elétrica etc.), que necessitam de manutenção ou conserto, deve estar localizado na 'área suja', de forma que os técnicos de manutenção não necessitem entrar na 'área limpa'. A drenagem (esgoto) deve ser provida de sistema que impeça o refluxo de água, gases e a penetração de insetos ou outros animais.

Condições Ambientais

As condições ambientais de um biotério devem ser adequadas a cada espécie e mantidas em níveis sem variações. A manutenção de condições ambientais estáveis assegura o padrão sanitário dos animais.

O relacionamento dos vários fatores que compõem a atmosfera do biotério, tais como temperatura, umidade relativa, ventilação, luminosidade e ruído, é tão interdependente que se torna praticamente impossível estudá-los separadamente, além do fato de que são os principais fatores limitantes para criação e manutenção de animais de laboratório.

Para roedores e lagomorfos, os seguintes padrões são recomendados:

• temperatura – de 18 ºC a 22 ºC (20 +/- 2);
• umidade relativa – de 45% a 55% (50 +/- 5);
• ventilação – de 10 a 15 trocas de ar por hora (volume do ambiente).

Para manter tais fatores nos padrões recomendados, é imprescindível a utilização de vários aparelhos, formando um sistema de condicionamento do ar.

LUMINOSIDADE – de 500 luxes no teto da sala de animais e cerca de 150 luxes a um metro do piso, fornecida por lâmpadas fluorescentes com o fotoperíodo de 12 horas 'claro' x 12 horas 'escuro', utilizando um *timer*.

RUÍDO – acima de 85 decibéis (d) é prejudicial aos animais de laboratório. Ruídos irregulares e inesperados produzem estresse, ao passo que os animais podem se adaptar a alguns ruídos contínuos. Em salas de animais, é recomendado de 50 d a 60 d.

BARREIRAS SANITÁRIAS

Visam a impedir que agentes indesejáveis, presentes no meio ambiente, tenham acesso às áreas de criação ou experimentação animal, bem como agentes patógenos em teste venham a se dispersar para o exterior do prédio.

As barreiras de proteção de um biotério compreendem vários elementos, desde os materiais usados na construção até os equipamentos mais sofisticados para filtração de ar ou esterilização de materiais.

Essas barreiras devem ser determinadas pela quantidade de animais, tipos de materiais, fluxos (de pessoal e de material), e serão mais sofisticadas quanto maior for a exigência microbiológica.

O conceito de barreira inclui as barreiras externas, chamadas periféricas (paredes externas, portas com exterior, telhado, tratamento de água etc.) e as internas (higienização corporal, pressão diferencial entre ambientes etc.). Assim sendo, barreira sanitária compreende todo um conjunto de elementos físicos, químicos, de instalações, de procedimentos de pessoal e uso de equipamentos, que tende a impedir a entrada de enfermidades que possam afetar os animais.

FÍSICAS

AUTOCLAVE – é o principal equipamento utilizado na esterilização de materiais e insumos. Essa deve possuir dupla porta, com intertravamento das mesmas, de forma a impedir que haja comunicação entre as áreas 'limpa' e 'suja'. Esse equipamento utiliza o processo de calor úmido para esterilização em conseqüência da pressão e do isolamento térmico, obtém-se temperaturas elevadas, podendo atingir até 135 ºC.
De modo geral, recomendamos o ciclo de esterilização de 121 ºC durante 20 minutos.
Os materiais normalmente autoclaváveis são: gaiolas plásticas, tampas de gaiolas, bicos, 'cama', uniformes, rações etc.

ESTUFA DE ESTERILIZAÇÃO – o processo de esterilização é por calor seco, que oxida as proteínas. É menos eficiente que a autoclave, pois o calor sem pressão tem menos poder de penetração. O tempo mínimo necessário para a esterilização é de 60 minutos à temperatura de 180 ºC.

RADIAÇÃO – a radiação ionizante, como a luz ultravioleta ou os raios gama, também destrói o metabolismo dos microorganismos.

A luz ultravioleta controla infecções transmitidas pelo ar e é útil para desinfecção de superfícies, porém possui baixa penetração (não atravessa vidro transparente e objetos opacos). É utilizada em guichês e/ou em *air locks*.
Os raios gama são utilizados para alimentos e equipamentos cirúrgicos e somente podem ser utilizados em estabelecimentos especializados. As fontes mais comuns são o cobalto 60 e o Césio 137.

Filtros para ar – têm por finalidade reter materiais ou substâncias indesejáveis. Retiram impurezas do ar ambiente e, dependendo de sua porosidade, podem reter microorganismos em suspensão.
No sistema de ventilação, é recomendado o uso de pré-filtro com a função de preservar o filtro terminal, retendo partículas maiores de 10 micras, bem como a de melhorar a eficiência do sistema.
Para segurança máxima, o suprimento de ar deve ser feito por meio de filtros absolutos de alta atividade, onde a eficiência é 99,997% na retenção de partículas maiores que 0,3 micra.

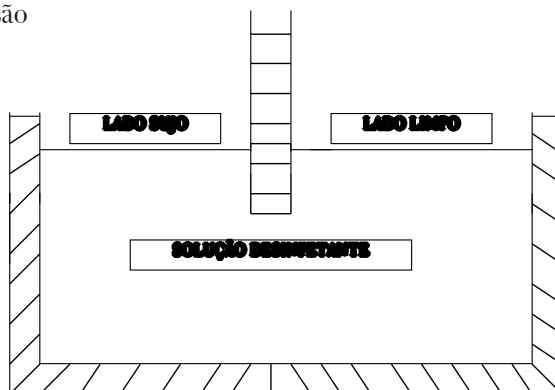
Químicas

Um agente, para ser satisfatório, deve ter capacidade de destruir todos os microorganismos na concentração aplicada, deve permanecer em contato com o agente infeccioso o tempo suficiente para destruição e não deve deixar resíduo.

Estufa de óxido de etileno – semelhante a uma autoclave, porém com a câmara hermética, por ser um elemento altamente explosivo quando em contato com o oxigênio.
O gás de Óxido de Etileno atua oxidando as proteínas dos seres vivos presentes nos materiais, matando-os. Necessita de um ciclo longo para esterilização e o material dever ser colocado em embalagem porosa para haver penetração. Os materiais normalmente esterilizados nesse equipamento são os mesmos citados para a autoclave, com exceção de rações e 'cama', pois concentram esse gás que pode intoxicar os animais. Esse equipamento é utilizado para esterilização de materiais que não possam ser esterilizados pelo calor.

Guichê e/ou porto de passagem – (entrada e saída de materiais) recomendamos que seja confeccionado na forma de um cilindro em PVC ou em aço inox, com no mínimo 45 cm de diâmetro por 70 cm de comprimento. Tanto na extremidade externa ('área suja') como na interna ('área limpa') é utilizada uma 'capa' que funciona como 'porta' e podem ser removidas, porém nunca ao mesmo tempo.

Tanque de imersão – possui comunicação entre a área 'limpa' e 'suja', porém deve ser construído de forma que o nível de solução desinfetante impeça a comunicação direta entre os dois ambientes.
O período de desinfecção varia com o agente desinfetante utilizado e sua concentração. Na desinfecção, o contato do microorganismo com o agente desinfetante é muito importante, portanto devemos providenciar, para que isso ocorra com maior facilidade, a limpeza do material e a remoção de gorduras e matéria orgânica.
Os agentes desinfetantes não agem instantaneamente, é necessário um tempo mínimo de ação, e seu efeito tem duração limitada. O acúmulo de matéria orgânica e microorganismos mortos diminui a concentração do desinfetante, reduzindo seu poder de ação. Por esse motivo, devemos substituir a solução regularmente. Para evitar a resistência de alguns microorganismos, recomendamos a troca periódica de desinfetante.

Figura 3 – Tanque de imersão

Principais Compostos Químicos Utilizados em Desinfecção e Esterilização

Ácido peracético – atua rapidamente, porém uma película de gordura é suficiente para impedir sua ação, devendo-se então fazer uma limpeza prévia do local a ser aplicado com detergente a 0,3% para dispersar as partículas de gordura. Uma solução aquosa 0,1 destrói esporos em 20 minutos, mas não atua sobre ovos de parasita. O ácido peracético é usado na esterilização de isoladores e/ou em guichês e em materiais que não podem ser esterilizados por processo físico.
Na composição de ácido peracético, cada 100 ml de solução contém ácido acético glacial, 88,22 ml, peróxido de hidrogênio a 30 volumes, 8,82 ml, e ácido sulfúrico, 2,96 ml, deixando em descanso 12 horas em geladeira antes do seu uso.
Quando em estado líquido, é corrosivo e inflamável. Em dias especialmente quentes e no caso de forte aquecimento do líquido, formam-se misturas explosivas mais pesadas que o ar.
O ácido peracético mistura-se completamente com a água e mesmo em grande diluição ainda é corrosivo.
Quando do manuseio do ácido peracético, é importante que o técnico esteja protegido com avental, luvas de borracha e máscara respiratória contra vapores, evitando o contato direto com a substância que pode causar irritações nos olhos, nas vias respiratórias e sérias lesões de pele.

Formaldeído – é utilizado tanto em desinfecção como em esterilização, principalmente de ambiente. Apresenta, porém, a desvantagem de ter baixo poder de penetração. É altamente desidratante.

Fenol e compostos fenólicos – (fenol, cresol, timol) são utilizados como desinfetante geral, porém são altamente perigosos por serem irritantes e corrosivos.

Álcoois etílico e propílico – desinfetantes básicos para pele, termômetros e materiais como pinças ou superfície de mesas e estantes. Agem desnaturando proteínas e na dissolução da membrana lipídica.

Cloro – é utilizado na desinfecção de águas. Tem a limitação de apresentar odor e sabor indesejáveis quando utilizado em grandes concentrações.

Quaternário de amônio – desinfecção ambiental com baixo poder irritativo quando inalado. Atua como agente bactericida, viricida e fungicida. Não é, porém, esporocida. Recomendamos para uso em tanque de imersão numa diluição de 1%.

Hipoclorito de sódio – na diluição de 1%-2%, por 10 minutos, atua na desinfecção de superfícies em todos os ambientes. Não deve ser usado em metal por ser corrosivo. A 5%, por 24 horas, atua na descontaminação de materiais com vantagem bactericida, porém é corrosivo e instável em água. Deve ser usado imediatamente após o preparo; é inativado por matéria orgânica.

Iodos – entre os halogêneos, o iodo sob a forma de tintura (2% a 5%) é um dos anti-sépticos mais utilizados na prática cirúrgica.
Os iodóforos consistem de iodo combinado com agentes de superfície, (detergente e geralmente ácido fosfórico). Eles atuam rapidamente e têm baixa toxicidade para os tecidos; são desinfetantes e deixam resíduos com efeitos antibacterianos. São utilizados em tanque de imersão.

Quadro 1 – Métodos de esterilização

MÉTODO	TRATAMENTO	APLICAÇÃO
Calor Úmido	121 ºC x 15 minutos 126 ºC x 10 minutos 134 ºC x 3 minutos	Ração, cama, gaiola de metal e de plástico, tampas de gaiolas, prateleiras, bebedouros, instrumentos cirúrgicos.
Calor Seco	160 ºC x 45 minutos 170 ºC x 18 minutos 180 ºC x 7,5 minutos 190 ºC x 1,5 minutos	Instrumentos cirúrgicos, tampas de gaiolas, gaiolas de metal, cama.
Óxido de Etileno com Vapor	1.200 mg / litro a 80 ºC x 1-2 h	Ração, cama, todo tipo de caixa, bebedouros, tampas de gaiolas, papel e livros, microscópios e outros equipamentos delicados.
Formaldeído com Vapor	5 ml de formalina/ 0,03 m^3 a 80 ºC x 1-2 h	Salas, utensílios de limpeza.
Paraformaldeído em Tabletes	Despolimerização de 5 g/m^3 a 20 ºC x 24h	Câmaras para formol, salas, utensílios de limpeza.
Ácido Peracético	2% x 20 minutos	Isoladores e *air lock*.
Radiação Gama	1-5 Mrads	Ração, seringas embaladas, material cirúrgico.
Radiação Ultravioleta	1.000-150.000 μ W/cm^2	Sistemas simples de passagem de material.
Filtração	Filtro Hepa (99,997% de eficiência para retenção de partículas < 0,5 μ)	Sistemas de ventilação.

Fonte: *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals* (1986).

Validação de Processos de Esterilização

A eficiência de qualquer método de esterilização deve ser comprovada periodicamente por meio de indicadores. Para tanto, cada ciclo de esterilização deve ser registrado em um protocolo e em freqüência a ser determinada por cada biotério. Para isso existem métodos químicos, biológicos e físicos.

Indicador químico – baseia-se na temperatura de fusão de um elemento químico quando atinge a temperatura. Indica somente que foi atingida a temperatura, não apontando o tempo em que o material esteve em contato com essa temperatura. Exemplos:

- Enxofre: funde-se a 119 ºC – 120 ºC, usado como indicador em esterilização por autoclave;
- Ácido Tartárico: funde-se a 170 ºC – 180 ºC, usado como indicador de esterilização por estufas.

Indicador biológico – são os mais aconselháveis, por se basear na resistência de esporos de microorganismos resistentes a altas temperaturas. São colocados estrategicamente junto com o material a ser esterilizado; após o processo, devem ser incubados em temperatura adequada para revelação se houve ou não inativação dos esporos.
São indicados *Bacillus stearothermophilus* para esterilização por vapor úmido sob pressão, e *Bacillus subtilis* para esterilização por óxido de etileno.

Indicadores físicos – são aparelhos sensíveis, colocados no interior da câmara interna das autoclaves para indicar as temperaturas atingidas. Por exemplo: termopares, registradores de temperatura, termômetro, microprocessadores etc.
Os indicadores devem ser colocados no centro e nos quatro cantos (superiores e inferiores) da câmara interna do aparelho utilizado para esterilização, seja por calor úmido, seco, radiação gama ou óxido de etileno. Os indicadores biológicos apresentam como desvantagem o tempo necessário para se obter o resultado do processo, tendo em vista que a leitura não é imediata. O método mais seguro de validação é por microprocessador, uma vez que terminado o processo se obtém o registro de todas as temperaturas alcançadas, assim como o tempo.

Outras barreiras

- *Air Lock* – são pequenos ambientes, com pressão positiva ou negativa, que têm por finalidade impedir a penetração ou a saída de ar de um ambiente contíguo, além de dar maior segurança quando colocados entre sala de animais e corredor de recolhimento ('sujo') no fluxo unidirecional.

- Quarentena – as dependências destinadas à quarentena não requerem instalações especiais, porém devem garantir o perfeito isolamento dos animais, uma rápida e eficiente higienização e desinfecção, bem como facilidade para recolhimento e destruição de cadáveres e dejetos.
  A quarentena deve ser localizada próxima à área de recepção e, além disso, dispor de espaço suficiente para abrigar somente uma espécie por ambiente.

- Gradiente de Pressão – as diferentes áreas de um biotério (corredor de distribuição, salas de animais, corredor de recolhimento) deverão ser dotadas de um gradiente de pressão, a fim de impedir contaminações. O fluxo do corredor de recolhimento para o corredor de distribuição deverá ser completamente banido e as pressões de ar deverão ser sempre maiores nas áreas limpas ou estéreis em que se requer maior assepsia.
  Exemplo:
  Biotério de Criação:
  ✓ Corredor de distribuição – P1
  ✓ Sala de animais – P2 (P1 > P2 > P3)
  ✓ Corredor de recolhimento – P3
  Biotério de experimentação:
  ✓ Corredor de distribuição – P1
  ✓ Sala de animais – P2 (P1 > P2)
  ✓ Corredor de recolhimento – P1

- Pinças – a utilização de pinças para o manuseio de pequenos roedores tem por finalidade diminuir o contato do operador com o animal e permite uma desinfecção deste instrumento entre manuseio de animais de gaiolas diferentes.

- Filtro para líquidos – a filtração pode ser feita por vários processos. O mais utilizado é por filtros porosos e sua eficiência depende das dimensões dos poros e do comprimento do canal filtrante, além das propriedades eletrostáticas.

- Cortina de ar – equipamento que tem por finalidade impedir a penetração do ar de um ambiente não controlado para um ambiente controlado.

- Higiene pessoal – normalmente encontramos microorganismos associados ao nosso corpo que fazem parte de nossa flora microbiológica normal.
  Os animais também possuem sua flora, que pode ser diferente da nossa. Dessa forma, quanto manuseamos o animal sem os cuidados necessários, podemos transmitir uma série de microorganismos patogênicos a

ele. Para evitarmos a contaminação dos animais por essa via, devemos tomar banho e vestir uma roupa estéril (paramentação) antes de ingressarmos na área de animais.

- Procedimentos – visam a normatizar e uniformizar as atividades, técnicas e fluxos de todos os elementos em um biotério.

No aspecto sanitário, os seguintes procedimentos são recomendados:

- ✓ retirada dos calçados e colocação de outros, usados somente no biotério, antes das áreas de animais;
- ✓ retirada de toda a roupa de rua, dos acessórios de uso pessoal e higienização corporal (banho);
- ✓ paramentação apropriada (calçados, meias, macacão, luvas, gorro e máscara);
- ✓ as vestimentas e calçados devem ser depositados em recipiente apropriado, antes de sair das áreas de criação;
- ✓ não se deve comer, beber ou fumar nas áreas de animais, área de higienização e depósitos;
- ✓ desinfecção de ambientes – todas as áreas envolvidas direta ou indiretamente com a criação devem ser rotineiramente limpas e desinfetadas. Essa desinfecção tem por finalidade evitar que agentes indesejáveis, que tenham conseguido ultrapassar as barreiras, cheguem aos animais.

Em uma área que não tenha animais e permita uma boa vedação, é de grande eficiência a utilização de formaldeído (35 ml de uma solução de formalina a 10% para cada m^3). Este deve agir por 24/48 horas com circulação de ar após esse período.

Na desinfecção de ambientes com animais, deve-se utilizar substâncias inofensivas a estes. As mais recomendadas são álcool e a amônia quaternária.

As mesas de trabalho e pias (se houver) devem ser desinfetadas imediatamente após o uso.

O piso deve ser higienizado e desinfetado diariamente.

As paredes, tetos, visores, portas, luminárias etc., devem ser higienizadas e desinfetadas semanalmente.

A acidificação da água de bebida dos animais, através da adição de uma parte de HCl (36,5% a 38%) para três partes de água, resultando em pH 2,5 a 3,2, evita o crescimento de pseudomonas spp. Os bebedouros das gaiolas dos animais devem ser trocados a cada 48 horas. Estudos demonstraram que a contagem de coliformes em água esterilizada nesses bebedouros excede o padrão para água potável após 24-48 horas de uso.

Bibliografia

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

Centro de Desenvolvimento e Apoio Técnico à Educação (Cedate). *Programação Arquitetônica de Biotérios*. Brasília: MEC, SG. Cedate, 1986.

De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Lane-Petter, W. & Perason, A. E. G. *The Laboratory Animal: principles and practice*. London/New York: Academic Press, 1971.

McSheehy, T. *Laboratory Animal Handbooks nº 7: control of the animal house enviroment*. London: Laboratory Animals Ltd., 1976.

Menéndez, R. C. Animales de Laboratorio en las Investigaciones Biomedicas. Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1985.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Maryland: National Research Council/Public Health Service, 1985.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). *Animales de Laboratorio: guia para instalaciones y cuidado de animales de laboratorio*. Publicacion Científica n.158. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C., 1968.

SAIZ MORENO, L.; GARCIA DE OSMA, J. L. & COMPAIRE FERNANDEZ, C. *Animales de Laboratorio: producción, manejo y control sanitario*. Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias/Ministerio da Agricultura, Pesca y Alimentación, 1983.

UNIVERSITIES FEDERATION FOR ANIMAL WELFARE (UFAW). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1986.

Equipamentos, Materiais e Insumos

Sebastião Enes Reis Couto

Introdução

Dada a especificidade das atividades desenvolvidas em um biotério, necessário se faz que tenhamos equipamentos e materiais com desenho apropriado para que possamos obter os resultados desejados.

Uma das medidas fundamentais no manejo de animais de laboratório é a de proporcionar-lhes alojamentos cômodos dentro da área exigida conforme a espécie.

Para obtermos um padrão de manejo ideal, necessário se faz, antes de tudo, conhecermos alguns dos direitos desses animais, entre os quais se destacam: mantê-los secos e limpos, conservá-los em um estado de relativa regulação térmica (conforme a espécie envolvida), oferecer-lhes espaço suficiente para que possam se movimentar com certa facilidade, dotá-los de alimentação e água convenientes e, em última palavra, 'garantir sua saúde e bem-estar'. Para isso, é necessário que se utilize, em um biotério, material específico e convenientemente selecionado, que atenda aos seguintes princípios gerais:

- limitar ou evitar o contato entre o animal e o técnico, visando ao conforto do animal;
- ser fabricado com material impermeável aos líquidos;
- ser resistentes à corrosão;
- não possuir rebarbas e bordas cortantes;
- ser desenhado e fabricado de modo a simplificar seu manuseio e manutenção, assim como a facilitar a limpeza e desinfecção;
- ser durável e de fácil reposição;
- ser autoclavável.

Materiais Desejáveis em um Biotério

- gaiolas em plástico (polipropileno ou policarbonato), usadas para camundongos, ratos e *hamsters*;
- gaiolas em plástico (polipropileno), usadas para cobaias e coelhos;
- tampas de aço inox, na forma de grade, com um rebaixamento para o interior da gaiola que serve de comedouro (usadas nas gaiolas para camundongos, ratos e *hamsters*);
- caixa em aço inox, tipo tabuleiro, com furos de 4 mm de diâmetro, usadas para esterilização de ração;
- frascos em plástico (policarbonato), usados para bebedouros;
- rolhas de borracha, tipo *buna*, usadas como tampa dos frascos (bebedouros);
- bicos em aço inox, usados nas tampas dos frascos (bebedouros);
- bebedouros automáticos, ligados diretamente na rede hidráulica, com válvulas que chegam em cada gaiola;

- suporte de bebedouros para gaiolas de coelhos e cobaias;
- comedouros em aço inox, usados nas gaiolas para coelhos e cobaias;
- bandejas em aço inox, usadas sob a gaiola para coelhos, para coletar os dejetos dos animais;
- estantes em aço inox, sobre rodízios, para gaiolas de camundongos, ratos e *hamsters*.
- *troiller* – estante em aço inox, sobre rodízios, para gaiolas de coelhos e cobaias;
- mesas em aço inox, sobre rodízios, para manuseio dos animais;
- caixas de papelão descartável para transporte dos animais;
- carros em aço inox, tipo plataforma ou chassi para transporte de materiais;
- caixas em aço inox, tipo engradado para frascos (bebedouros);
- carros tipo cuba para transporte e depósito de ração.

Características Desejáveis para as Gaiolas dos Animais

- serem seguras, não permitindo fuga dos animais;
- permitirem, com facilidade, a observação do animal e sua alimentação;
- terem ventilação apropriada;
- serem higiênicas e de fácil limpeza;
- serem confortáveis, permitindo aos animais ampla liberdade em seus movimentos;
- permitirem fácil acesso aos alimentos e à água.

Quadro 1 – Espaço mínimo recomendado para gaiolas dos animais de laboratório e a temperatura em seu interior

ANIMAL	OCUPANTE	ESPAÇO POR ANIMAL (cm^2)	ALTURA (cm)	TEMPERATURA
Camundongo	Em crescimento	65		
	Adultos	100	13-15	22-25
	Fêmea c/ filhotes	160		
Rato	Em crescimento	150		
	Adultos	250	18	20-25
	Fêmea c/filhotes	800		
Hamster	Em crescimento	100		
	Adultos	150	18	21-24
	Fêmea c/filhotes	900		
Cobaia	Em crescimento	300		
	Adultos	650		16-20
	Fêmea c/filhotes	800		
Coelho	Em crescimento	3.700		
	Adultos	4.600	38	16-20
	Fêmea c/filhotes	7.400		

Fonte: *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (1980).

Características Desejáveis para as Estantes das Gaiolas

- estarem apoiadas sobre rodízios, permitindo o deslocamento para higienização e limpeza das salas;
- possuírem distância adequada entre prateleiras, possibilitando a retirada das gaiolas e bebedouros, facilitando a administração da ração sem obstáculos e com segurança;
- terem altura não superior a 1,80 m para que haja segurança na retirada das gaiolas que estão na prateleira superior;
- permitirem condições para incidência de luz e exposição à ventilação semelhante para todas a gaiolas.

Figura 1 – Estantes e gaiolas para criação de coelhos

Fonte: Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz.

Equipamentos Desejáveis em um Biotério

Autoclave

É o principal equipamento de esterilização de materiais e insumos em um biotério.

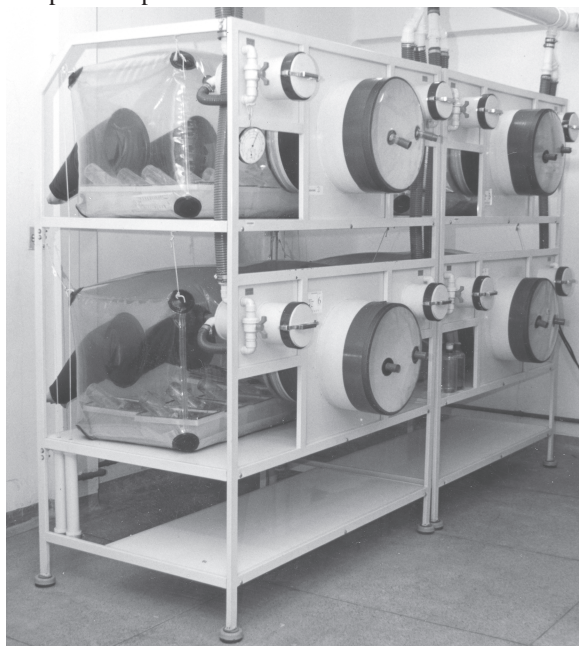
Este equipamento deve ter dupla-porta, com intertravamento das mesmas, de forma a impedir que haja comunicação entre áreas de higienização e estoque de materiais esterilizados.

Figura 2 – Autoclave de dupla-porta

Fonte: Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz.

Isoladores

Este equipamento, mais sofisticado que os demais, oferece maior segurança e tem sido utilizado, principalmente, para manter animais livres de germes e estudos de alto risco. Basicamente, é constituído de uma câmara de polivinil, normalmente em forma de paralelepípedo. Em uma de suas faces há um par de luvas para manipulação no interior e em outra face uma 'porto de entrada'.

Figura 3 – Isolador flexível com pressão positiva

Fonte: Centro de Criação de Animais de laboratório/Fiocruz.

Nas laterais, instalam-se os filtros de entrada e saída de ar. A renovação do ar é mantida através de um ventilador (isoladores com pressão positiva) ou de um exaustor (isoladores com pressão negativa).

A introdução de insumos e materiais é feita pelo 'porto' com auxílio do cilindro de esterilização, no qual os materiais foram previamente esterilizados. Para maior facilidade e segurança, utiliza-se a luva de transferência que interliga o 'porto' ao cilindro.

A utilização de isoladores com pressão negativa em estudos de alto risco confere ao pesquisador um eficiente método de segurança, além de propiciar a vantagem de ter numa mesma sala isoladores com animais portadores de diferentes germes.

Estante com Microisoladores

É um equipamento que permite o estabelecimento de sistema fechado de criação para cada microambiente, ou seja, para cada gaiola de animais.

É constituído por dois motores, responsáveis pelo insuflamento e a exaustão do ar por meio de ductos com orifícios, para cada gaiola de animais, sob as prateleiras. O ar insuflado e/ou exaurido passa por dois filtros absolutos de alta atividade, onde a eficiência é 99,997% na retenção de partículas maiores de 0,3 micra, que se encontram próximos aos motores e sobre as tampas de cada gaiola de animais.

As gaiolas providas desse filtro permitem o isolamento do meio ambiente, dando segurança aos animais quando transportados. Utiliza-se uma capela de fluxo laminar para o manejo dos animais.

Figura 4 – Estante com microisoladores e capela de fluxo laminar

Fonte: Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz.

Forno de Esterilização

É um equipamento também utilizado em biotério para materiais que não possam ser esterilizados por calor úmido.

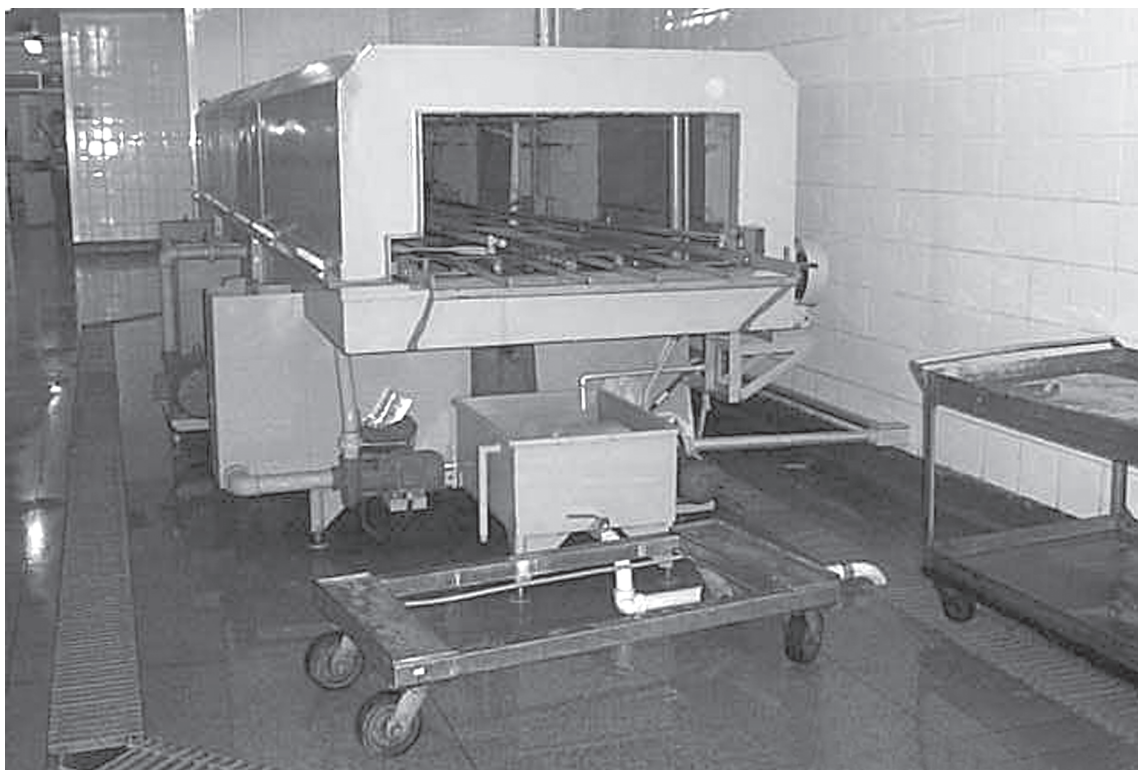
Câmara para Eutanásia

Seu tamanho depende das espécies a serem sacrificadas e normalmente se utiliza o gás dióxido de carbono (CO_2).

Este equipamento deve ter uma boa vedação para evitar que o gás atinja o meio ambiente. Deve ser dotado de um visor para que os animais possam ser observados durante o sacrifício.

Máquinas de Lavar Gaiolas, Frascos e Bicos

Existem muitos tipos dessas máquinas, desde as mais simples às mais sofisticadas (semi-automáticas e totalmente automatizadas). Seu tamanho e capacidade dependem do tipo e do número do material a ser lavado.

Figura 5 – Máquina de lavar gaiolas de coelhos e cobaias

Fonte: Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz.

Insumos Utilizados em um Biotério

Denominamos insumos todos os elementos que entram na produção de determinado bem ou serviço, tais como: ração, água, maravalha e feno.

Ração

A nutrição adequada constitui um dos fatores mais importantes para o animal de laboratório, uma vez que oferece condições de atingir seu potencial genético, de crescimento, de reprodução, de longevidade e de resposta a estímulos.

Fornecer alimentação adequada às várias espécies de animais de laboratório envolve a formulação de dietas com concentrações requeridas de aproximadamente 50 componentes essenciais e a manipulação de numerosos fatores relacionados com a sua qualidade.

O tipo de ração, sua biodisponibilidade (a quantidade de nutrientes que o organismo pode absorver e metabolizar), os procedimentos relacionados à preparação e estocagem e à concentração de contaminantes químicos são exemplos de fatores que exercem profundos efeitos no desenvolvimento animal.

A maioria das espécies possui hábito alimentar complexo. Dessa forma, a dieta balanceada, isto é, a ração industrializada, apresentada na forma de peletes, atende a todas as necessidades alimentares dos animais, e não deve ser suplementada. Assim, a utilização de ração é vantajosa, pois, além de proporcionar nutrição adequada, é de fácil manuseio e de melhor rendimento.

Ao escolhermos uma ração para os animais, devemos verificar se é produzida com ingredientes de boa qualidade e se a empresa produtora tem condições de fabricação que atendam às exigências nutricionais e microbiológicas. Outra preocupação que devemos ter é quanto à não-inclusão de bacteriostáticos e se há indicação do prazo de validade do produto e condições adequadas de armazenamento.

As dietas são esterilizadas, geralmente, utilizando-se métodos de calor úmido ou por radiação.

Esterilização por Calor Úmido

Normalmente é feita em autoclave, a 121 ºC, durante 20 minutos. A ração deve ser acondicionada na autoclave, de modo a permitir que o vapor atinja todas as partes do material. Podemos utilizar caixas tipo tabuleiro com orifícios, embalagens microperfuradas (plástico ou papel) etc.

Esterilização por Radiação

É feita utilizando-se raios gama. Em termos de manutenção da qualidade nutritiva e segurança, esse é o melhor método de esterilização e também o mais caro.

Hidratação

A água é um dos mais importantes componentes do organismo e a sua ausência é incompatível com a vida. Dessa forma, é imprescindível que os animais de laboratório tenham livre acesso a ela. As necessidades básicas de água variam em virtude da dieta (ração), condições ambientais e espécie animal.

A água oferecida aos animais deve ter os mesmos padrões de qualidade de água potável para humanos, porém necessita de tratamento antes de ser oferecida, visando a impedir a veiculação de agentes e substâncias nocivas que podem comprometer a qualidade sanitária das colônias.

A freqüência da substituição da água dos bebedouros reduz o desenvolvimento de microorganismos. Desse modo, quanto menor for o espaço de tempo da sua substituição, menor será o risco de ocorrer doenças nas criações.

Há diferentes processos de tratamento da água a serem administrados aos animais de laboratório:

processos químicos – acidificação através da adição de uma parte de HCl (36,5% a 38%) para três partes de água, resultando em o pH 2,5 a 3,2, evita o crescimento de *Pseudomonas* spp;

processos físicos – filtração, esterilização por autoclavação.

Para adotarmos um desses processos, devemos considerar a eficiência e o custo em relação ao padrão sanitário dos animais que mantemos ou criamos.

Quadro 2 – Quantidade necessária de ração e água animal/dia

ANIMAL	RAÇÃO (g)		ÁGUA (ml)	
ADULTO	Quantidade Ingerida	*Consumo (Ingerida + Desperdício)	Quantidade Ingerida	*Consumo (Ingerida + Desperdício)
Camundongo	3-6	10	3-7	10
Rato	10-20	25	20-45	50
Hamster	7-15	25	8-12	15
Cobaia	20-25+Vit. C	45	60-75	90
Coelho	75-100	130	240-300	350

Fonte: *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (1980).

Cama

Os animais são mantidos em gaiolas em que o piso é coberto por uma camada de maravalha (raspa de madeira picada), casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar desidratado, sabugo de milho ou outro produto, dependendo da facilidade de obtenção e do custo.

Qualquer que seja o material escolhido para as camas, deve ser assegurado que as plantas que lhes deram origem não receberam inseticidas durante o cultivo.

O material utilizado para 'cama' tem por finalidade absorver a urina dos animais e a água derramada no interior da gaiola, mantendo seu fundo sempre seco, bem como servir de isolante térmico para reduzir a condução de calor do corpo dos animais através do fundo da gaiola.

O material utilizado para 'cama' dos animais deve possuir as seguintes características:

- ser inócuo, isto é, não ter sido tratado com substâncias tóxica;
- não ser oriundo de madeiras resinosas;
- ter alto poder de absorção;
- permitir o isolamento térmico – as propriedades isolantes diminuem com o aumento da umidade;
- ser confortável para proporcionar sensação de bem-estar;
- ser desprovido de cheiro;
- ser facilmente descartável – é vantajoso que o material possa ser incinerado, pois a 'cama' poderá estar contaminada (química ou biologicamente);
- ser facilmente transportado, manuseado e estocado (embalagens adequadas a estes fins).

A 'cama', por estar em contato íntimo com os animais, fazendo parte do seu microambiente, deve ser tratada, evitando-se assim o aparecimento de doenças nas colônias.

Seu tratamento consiste na autoclavação, 121 ºC durante 30 minutos, em embalagens que permitam a penetração do vapor até a camada central.

Quadro 3 – Quantidade necessária de 'cama' de madeira de pínus nas gaiolas e bandejas*

ANIMAL	GAIOLA (mm)	QUANTIDADE (g)
Camundongo	300 x 195 x 120	60
Rato e *Hamster*	410 x 340 x 175	100
Cobaia	900 x 600 x 300	1100
Coelho	900 x 600 x 30 (bandejas sob gaiola)	260

*Quantidade para troca de gaiolas e bandejas a cada 2 (dois) dias.
Fonte: Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz.

Feno

A qualidade de um material ideal para ninho é semelhante àquela do material utilizado para 'cama', exceto que o animal deve ser capaz de construir um ninho adequado e o material não deve absorver a umidade, mas permitir que escorra 'para a cama' absorvente, deixando que o ninho fique seco.

O feno de capim *cort-cross* é adequado para o ninho dos coelhos, oferecendo ao animal conforto e facilidade na construção do ninho. Também é utilizado nas gaiolas das cobaias, juntamente com a cama de madeira de pínus, com o objetivo de ocupá-las roendo este material, evitando, assim, que elas arranquem os pêlos umas das outras.

Referências Bibliográficas

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1980.

Bibliografia

Centro de Desenvolvimento e Apoio Técnico à Educação (Cedate). *Programação Arquitetônica de Biotérios*. Brasília: MEC/SG./Cedate, 1986.

De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2 ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Lane-Petter, W. & Perason, A. E. G. *The Laboratory Animal: principles and practice*. London/New York: Academic Press, 1971. 279p.

McSheehy, T. *Laboratory Animal Handbooks nº 7: control of the animal house environment*. London: Laboratory Animals Ltd., 1976.

Menéndez, R. C. *Animales de Laboratorio en las Investigaciones Biomedicas*. Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1985.

National Institutes of Health (NIH). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Maryland: National Research Council/Public Health Service, 1985.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). *Animales de Laboratorio: guia para instalaciones y cuidado de animales de laboratorio*. Publicacion Científica n.158. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C., 1968.

Saiz Moreno, L.; Garcia de Osma, J. L. & Compaire Fernandez, C. *Animales de Laboratorio: producción, manejo y control sanitario*. Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias/Ministerio da Agricultura, Pesca y Alimentacion, 1983.

Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 5th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1976.

7

Macro e Microambientes

Belmira Ferreira dos Santos

Introdução

O ambiente onde se encontra o animal é dividido em macro e microambientes, sendo a gaiola o divisor entre os dois. Tudo o que se encontra do lado externo da gaiola constitui o macroambiente e tudo o que se encontra em seu interior constitui o microambiente.

Macroambiente

Instalações

Sua arquitetura e manutenção adequadas influenciam diretamente no manejo. As áreas destinadas aos animais devem ser isoladas fisicamente de laboratórios de controle ou experimentação e áreas administrativas; além disso, devem possuir estrutura que as torne à prova de agentes infecciosos e vetores, como insetos e roedores silvestres. Elas compreendem as salas para as colônias de animais e as áreas de apoio, como as áreas de higienização e esterilização, salas de estoque de materiais limpos e insumos, corredores de acesso etc.

A arquitetura influencia e define o tráfego de animais e pessoal, o qual deve ser o menor possível. Para isso, são estabelecidas as barreiras sanitárias, que, de acordo com as suas características, dão a classificação do biotério quanto ao seu *status* microbiológico.

Temperatura e Umidade Relativa

A temperatura e a umidade relativa do ambiente são importantes para a manutenção da higidez animal. A temperatura costuma ser mantida pelo resfriamento ou aquecimento do ar que entra nas salas de criação, formando um complexo sistema de condicionamento de ar. A temperatura de conforto para pequenos roedores é de 21 °C a 24 °C. As cobaias e os coelhos se adaptam melhor a temperaturas de 18 °C a 20 °C. A gaiola serve de divisor dos macro e microambientes, e é sabido que a temperatura pode aumentar de 3 °C a 5 °C, no seu interior, assim como a umidade é sempre mais elevada.

As mudanças bruscas de temperatura costumam provocar estresse, com queda de resistência e maior susceptibilidade às infecções. Temperaturas altas provocam queda na reprodução e até sua parada total, enquanto temperaturas baixas podem provocar afecções respiratórias.

A umidade relativa também exerce importante papel no bem-estar animal. Com a liberação contínua de vapor d'água, através da respiração e pela evaporação da urina, a umidade dentro das salas tende sempre a aumentar, tornando-se necessário um sistema que retire eficazmente o excesso de água do ambiente. Esse

processo é realizado durante a troca de ar da sala, que deve ser regulada para que a retirada do vapor não seja excessiva, tornando o ambiente muito seco, o que provoca problemas respiratórios com ressecamento de mucosas e pele e o surgimento de feridas nos animais (a afecção denominada *ringtail*, nos ratos, é conhecida por surgir em ambientes com baixa umidade). A umidade muito alta, entretanto, propicia problemas respiratórios. A umidade ideal para roedores e lagomorfos é de 45% a 55%.

Iluminação

O fotoperíodo (ciclo de luz/escuridão) é, sem dúvida, um dos mais importantes itens que influenciam o ritmo biológico do animal de laboratório, atuando no seu comportamento e na reprodução. Sendo a maioria dos roedores animais noturnos, a luz fria lhes é menos irritante do que a luz incandescente e a iluminação natural é contra-indicada, já que não pode ser controlada. Períodos de luz de 12-14 horas/24 horas parecem ser os mais adequados à reprodução dos animais e a sua manutenção.

Ventilação e Filtração do Ar

Um sistema de ventilação que produza trocas regulares do ar das salas de animais é essencial para controlar a temperatura e a umidade, e diluir os possíveis poluentes químicos (resíduos de desinfetantes usados na higienização das salas). O número de trocas recomendado é de 10 a 15/hora. A recirculação do ar requer um sistema que seja capaz de retirar do ar partículas de patógenos. A filtração tem por objetivo a retenção de partículas de poeira e microorganismos, que poluem e contaminam o ambiente. A filtração ótima está em 99,97% de retenção de partículas acima de 0,5mm.

As salas de criação devem possuir, ainda, um gradiente de pressão diferenciado dos corredores para evitar solução de continuidade com essas áreas e possíveis contaminações. Em biotérios de criação, a pressão do corredor de distribuição é superior à das salas, onde é superior à do corredor de recolhimento. Em infectórios, as pressões dos corredores são superiores às das salas.

Ruído

O ruído, apesar de inevitável, deve ser controlado para que não afete os animais, tendo em vista que, quando atinge níveis acima do tolerado, principalmente em roedores, provoca estresse, podendo levar a convulsões e até à morte. Os ruídos também podem afetar o operador, sendo aconselhável o uso de protetores em ambientes como as áreas de higienização e esterilização. O nível aceitável de ruídos é de até 85 decibéis.

Animais Silvestres e Vetores

É sabido que a transmissão de grande parte das doenças e zoonoses que afetam os animais de laboratório se dá por vetores ou animais silvestres. Impedir o seu acesso é o papel primordial das barreiras sanitárias e do projeto das instalações, mas também os técnicos devem ser treinados de modo a eliminar a transmissão das zoonoses. Programas de desinsetização e controle de roedores silvestres e pragas devem ser postos em prática para evitar que, de alguma maneira, estes tenham acesso aos animais, ou aos equipamentos, materiais e insumos utilizados nas colônias.

Gaiolas

Para roedores e lagomorfos, temos basicamente dois tipos de gaiolas: as de fundo sólido e as de fundo perfurado. As primeiras são mais utilizadas por animais pequenos (camundongos, ratos, *hamsters*, *gerbis*, cobaias etc.); as de fundo perfurado são destinadas a coelhos. Geralmente, são fabricadas em metal ou plástico (policarbonato ou polipropileno) resistentes à autoclavação. Quando de metal, o aço inoxidável é o mais indicado. Algumas vezes o ferro galvanizado também é utilizado, mas elas se tornam menos duráveis e os animais acabam por ingerir metais, principalmente o zinco, seja por lamberem os pêlos que encostam nas paredes das gaiolas e se impregnam com os elementos, seja por lamberem a própria gaiola.

Atualmente, as gaiolas mais utilizadas são feitas de plástico, por serem mais baratas, mais leves, bastante duráveis e resistirem aos métodos de esterilização. O desenho das gaiolas deve ser tal, que não permita 'cantos vivos' em seu interior, já que os animais tendem a roer qualquer saliência para tentar escapar. No caso dos pequenos roedores, as gaiolas seguem o desenho retangular e são fechadas por cima com uma 'tampa' de aço inoxidável, que permite a acomodação da ração peletizada e o frasco bebedouro. As tampas são muito importantes, porém restringem a ventilação, o que nos leva a considerar cuidadosamente a adoção de campânulas ou filtros por cima das gaiolas, uma vez que isso aumenta o nível de amônia em seu interior. O ideal é que tenhamos um sistema de ventilação forçada para dentro das gaiolas.

Microambiente

Cama

A 'cama' é usada no fundo das gaiolas ou em bandejas, por baixo das gaiolas de fundo perfurado. Sua principal função é absorver a urina dos animais e aquecê-los, além de prover as fêmeas com material para a construção de ninhos para abrigar as ninhadas, quando em contato direto com os animais.

As características de uma boa 'cama' são: alta capacidade de absorção de umidade, sem desidratar ou machucar os recém-natos; não conter poeira; não ser abrasiva; estar livre de agentes químicos ou patogênicos; ser de baixo custo e de fácil aquisição. O material para cama mais utilizado é a maravalha (raspas de madeira) de pínus.

A 'cama' se constitui uma das mais importantes fontes de contaminação para os animais; por isso, deve ser sempre autoclavada antes de ser utilizada. Seu fornecedor deve ser idôneo e garantir que não houve contato do material com roedores silvestres e/ou pássaros – vetores das principais doenças que acometem os animais de laboratório –, além de produtos químicos como agrotóxicos e resinas.

A quantidade de 'cama' a ser colocada na gaiola é muito importante, já que pouca quantidade priva a fêmea de material para a construção do ninho, levando à morte dos recém-nascidos, e seu excesso pode gerar calor, aumentando a temperatura.

Densidade Populacional

O espaço requerido é aquele onde os animais possam apresentar postura adequada e movimentação ou comportamento padrão da espécie. Animais mantidos isolados ou superpopulados, por longos períodos, desenvolvem estresse.

Odores

O odor é muito importante para os animais de laboratório, uma vez que a identificação e o reconhecimento dos indivíduos se faz pelo cheiro inato de cada espécie e é através dos feromônios que machos e fêmeas se encontram para a reprodução e delimitam os seus territórios. A esses odores, juntam-se a amônia da urina e outros odores, como o da ração, o dos técnicos da sala etc.

A troca dos animais das gaiolas sujas para as limpas interfere diretamente nesse universo. Deve ser observada cuidadosamente, pois devemos eliminar os odores irritantes (amônia) e os alheios à espécie, mas não os feromônios, pois cada vez que o animal é trocado, fabrica nova quantidade de feromônios e de outras substâncias para marcar seu território e atrair parceiros. A troca demasiada estressa o animal, que acaba produzindo essas substâncias em excesso. A falta da troca faz com que a amônia e outros odores se concentrem em níveis intoleráveis dentro das salas, prejudicando os animais e os técnicos. Os odores devem ser removidos através de uma boa ventilação, com renovação do ar, e pela sanitização dos materiais e equipamentos.

Água e Ração

A água oferecida aos animais deve ser microbiologicamente pura (esterilizada e acidificada), uma vez que se constitui importante fonte de contaminação. Deve ser trocada com freqüência, para evitar que se transforme em meio propício à proliferação de microorganismos existentes na boca do animal e que são passados aos bicos, juntamente com restos de ração, quando este bebe. Deve ser oferecida *ad libitum* em frascos bebedouros apropriados.

Os frascos são de material autoclavável e de preferência transparentes. Os bicos, por onde o animal bebe, devem ser de aço inoxidável e autoclavados antes de entrar em contato com os animais. Devem ser inspecionados para que não haja entupimentos, impedindo o acesso do animal à água.

A ração ideal é a industrializada, na qual o requerimento nutricional de cada espécie é levado em conta na formulação, o que garante uma alimentação balanceada. A ração deve ser autoclavável para evitar contaminações. Também é oferecida *ad libitum*, e a quantidade não consumida deve ser desprezada.

Nos casos em que a ração fresca ou a complementação se fazem necessárias, os alimentos devem ser inspecionados e acondicionados em local apropriado, mas nunca em grandes quantidades, para se evitar a deterioração.

Bibliografia

Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1986.

8

Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao *Status* Sanitário

Sebastião Enes Reis Couto

Introdução

Quanto mais uniforme os animais utilizados na experimentação, menor será o número necessário para atingirmos o padrão de exatidão ou receptibilidade. Por isso, os pesquisadores estabeleceram os animais como um dos mais refinados componentes da experimentação.

Após vários anos de pesquisa, foram descobertas numerosas linhagens de animais consangüíneos e híbridos capazes de reduzir as variáveis causadas por diferenças genéticas e, mais recentemente, classificaram os animais quanto ao *status* sanitário ou ecológico, visando a prevenir erros induzidos por diferenças ambientais.

A classificação dos animais quanto ao *status* sanitário ou ecológico pode ser definida como a relação dos animais com o seu particular e específico ambiente. Este ambiente inclui os organismos associados aos animais e os organismos presentes dentro dos limites do ambiente físico e barreiras sanitárias. O conjunto de organismos associados é denominado microbiota (vírus, bactérias, fungos e parasitas), e quanto mais eficientes forem as barreiras sanitárias deste ambiente, menores as chances de contaminação dos animais.

A partir dessa definição, podemos classificá-los em três grupos distintos:

- Animais Gnotobióticos;
- Animais Livres de Germes Patogênicos Específicos (*Specific Pathogen Free* – SPF);
- Animais Convencionais.

Animais Gnotobióticos

Gnotobiótico – palavra de origem grega (*gnoto* = conhecer + *biota* = vida)

Definição: são animais que possuem microbiota associada definida e devem ser criados em ambientes dotados de barreiras sanitárias absolutas. Outra definição comumente usada: são os animais que possuem flora microbiológica conhecida, não existente ou não detectável.

A produção de animais desse padrão sanitário somente é possível mediante sua manutenção em equipamentos especiais, como isoladores.

A evolução tecnológica dos isoladores permitiu o avanço da gnotobiologia, ciência que teve início com Pasteur, que questionava a sobrevivência de organismos superiores na ausência de bactérias. Nesse tipo de estudo, equipamentos como os isoladores são imprescindíveis. Diferentes materiais foram utilizados no desenvolvimento das primeiras unidades, que evoluíram para aço inox plástico rígido, acrílico, fibra de vidro etc. (Gustafsson, 1948). Porém, os isoladores rígidos apresentaram algumas dificuldades práticas e técnicas

(acomodação da pressão etc.). O sucesso definitivo no avanço tecnológico dos isoladores somente foi alcançado em 1957, quando Trexler e Reynolds desenvolveram o isolador flexível, mais adequado pela transparência, que permite a visão total de seu interior e pela flexibilidade, que facilita a sua manipulação. Esse novo modelo permitiu o uso mais extenso dos isoladores com aplicabilidade prática em diferentes áreas, como em laboratórios de pesquisa, biotérios e até na indústria.

O termo gnotobiótico (vida conhecida) pode ser utilizado tanto para animais livres de germes como para aqueles contaminados com um ou mais organismos detectáveis. Assim, em virtude da quantidade de microbiotas que estejam associados ao animal, este pode ser classificado como *germfree* (GF) ou Flora Definida (FD).

Germfree (GF)

Definição: são animais totalmente livres de microbiota, isto é, isentos de quaisquer parasitas internos e externos, bactérias, fungos, protozoários, algas, richetsia e vírus. Um termo similar usado neste contexto é animais axênicos (animais livres de vida associada).

Vários animais têm sido criados e mantidos livres de germes, tais como: ratos, camundongos, cobaias, coelhos, galinhas, porcos, peixes, macacos, carneiros e cães. Embora com alguns desses animais não se tenha obtido sucesso em sua reprodução no ambiente GF, os camundongos e ratos têm respondido muito bem.

Obtenção: o método primário de obtenção de animais GF, é por meio da intervenção cirúrgica (histerectomia estéril do útero gravídico) e sua subseqüente introdução num isolador estéril. Os embriões em desenvolvimento são protegidos da contaminação pela barreira placentária, uma membrana semipermeável constituída de tecidos placentários que limita o tipo e a quantidade de material 'trocado' entre a mãe e os fetos no útero. Dentro desse ambiente protegido, os fetos são essencialmente descontaminados, mas, após o parto, são geralmente expostos a vários organismos. Para se obter camundongos GF, o problema está na preservação do estado virtual não-contaminado após a perda da proteção da barreira placentária.

Para que os recém-nascidos possam sobreviver, o útero deve ser removido da camundonga grávida (fêmea doadora) no período de 24 horas que antecede o parto. O período de gestação da camundonga varia em cada linhagem, mas geralmente seu limite fica entre 19 a 21 dias.

Após a morte da mãe doadora, mediante o deslocamento cervical, a parte ventral do abdômen é preparada para a cirurgia. Inicialmente, faz-se a tricotomia e, então, o corpo da fêmea é imerso numa solução esterilizante (à temperatura corporal de 36 °C a 37 °C). Coloca-se o animal em uma bancada e sobre o abdômen uma tira adesiva de plástico estéril. Uma incisão na linha média é feita através do plástico e da pele.

A seguir, abre-se a pele e o peritônio, expõe-se o útero e liga-se próximo aos ovários e na cérvix com fio cirúrgico ou com pinças hemostáticas, cortando-o em seguida. Liberado o útero, este deve ser colocado em um recipiente contendo solução esterilizante, com temperatura entre 36 °C a 37 ºC, com o objetivo de proteger os filhotes em seu interior contra possível contaminação e choque térmico. Logo em seguida, transporta-se para o interior de um isolador o recipiente com o útero, através de um tanque de imersão com substância esterilizante, ou através do porto de passagem do isolador, utilizando substância esterilizante (ácido peracético), vaporizado com auxílio de um nebulizador acionado por corrente de ar comprimido.

Uma vez dentro do isolador, remove-se o útero gravídico do recipiente e, então, cuidadosamente, retiram-se os filhotes, limpando-os e ativando-lhes a circulação e a respiração, mantendo-os aquecidos e ligados à placenta por um pequeno período antes de removê-los para a gaiola da ama-de-leite.

Os recém-nascidos obtidos assepticamente nos isoladores estéreis têm a opção de usar uma ama-de-leite GF ou amamentação manual para mantê-los.

O parto da ama-de-leite deve ocorrer sempre um pouco antes da introdução do útero da fêmea doadora para assegurar aos recém-nascidos a alimentação, já que estará em plena lactação. É muito importante ter a certeza de que a ama-de-leite e os recém-nascidos não sejam perturbados por algumas horas, a fim de que sua adaptação seja facilitada. Para confundir o olfato da ama-de-leite, recomendamos o uso da própria 'cama' e/ou da urina sendo colocada sobre os recém-nascidos, compelindo-a a aceitá-los como seus próprios filhos.

Se não houver nenhuma ama-de-leite disponível, é necessário amamentar os recém-nascidos manualmente. Essa técnica é extremamente cansativa, trabalhosa e nem sempre bem-sucedida, tornando-se frustrante na maioria dos casos e sendo raramente utilizada.

A maioria das colônias de GF é obtida pelo método de ama-de-leite. Estas podem ser obtidas em criações comerciais e usadas para obtenção de GF e de outra classificação ecológica. O estado GF é o primeiro degrau para atingirmos os animais de Flora Definida e SPF.

Todo material (ração, água, cama, gaiolas etc.) a ser introduzido no isolador deve ser esterilizado, porém podem ocorrer falhas na operação e materiais não-estéreis que podem comprometer a qualidade dos animais.

O fato de que algumas bactérias e muitos vírus são difíceis de se cultivar ou detectar limita o grau ao qual o animal pode ser chamado de GF, assim como também os procedimentos operacionais para a obtenção desses animais não são infalíveis. Infelizmente, a barreira placentária não bloqueia toda contaminação. Alguns vírus, portanto, são conhecidos por transporem essa eficiente barreira. Um exemplo desse tipo de transmissão intra-uterina ou vertical é o vírus da Cório Meningite Linfocítica. Pollard (1966) indicou que os agentes da leucemia entraram na colônia pela barreira placentária ou pelo plasma seminal sem que tivessem certeza da rota.

Se animais GF podem ser obtidos de colônias existentes que tenham sido testadas e são reconhecidas como livres de agentes que possam ser transmitidos verticalmente, as chances serão maiores de se alcançar o verdadeiro estado GF. Em qualquer nível para a classificação desses animais, devemos testá-los para uma ampla variedade de microorganismos, uma vez que os animais GF não são antígenos *free*. Existem organismos mortos mais intactos nos alimentos e na 'cama', diretamente associados aos animais e que estão sujeitos a numerosas estimulações antigênicas.

UTILIZAÇÃO: apesar dessas limitações, informações suficientes foram utilizadas para fazer dos animais GF uma ferramenta adicional de pesquisa no estudo do câncer, da imunologia, das radiações, doenças entéricas, dentárias e nutricionais etc.

FLORA DEFINIDA (FD)

DEFINIÇÃO: são animais GF que foram intencionalmente contaminados com microorganismos ou parasitos específicos. São continuamente monitorados para constatar a presença dos organismos selecionados e a ausência de outros.

Também o termo monoxênico é usado quando o animal foi contaminado, deliberadamente, com apenas um tipo de microbiota, o que equivale a dizer que possui um microbiota associado. Dixênico é o termo designado ao animal contaminado, deliberadamente, com dois tipos de microbiota e polixênico é relativo ao animal contaminado, deliberadamente, com vários microbiotas.

OBTENÇÃO: o primeiro passo para a obtenção de animais de FD é obter-se animais GF, uma vez que esse estado é alcançado e confirmado por teste laboratorial. Qualquer número de microorganismos pré-selecionados pode ser administrado, de várias maneiras, aos animais. Um dos métodos adotados é a transferência dos animais GF do isolador para um equipamento de barreira restrita (outro isolador). Uma vez dentro desse equipamento, o animal GF pode ser alimentado com ração saturada com

microorganismos específicos. Os animais nascidos nesse ambiente são contaminados por microorganismos através da amamentação, contato com a ração, com a 'cama' e com as fezes de seus pais. Para maior confiabilidade, inoculamos cultura pura dos contaminantes selecionados, antes de retirá-los do isolador. Depois que a flora selecionada estiver estabelecida, os animais devem ser testados e então transferidos para outro isolador.

utilização: a seleção da flora ideal depende do pesquisador que vai usar o animal. Uma quantidade considerável de pesquisa tem sido feita para restabelecer a relação entre a flora entérica selecionada e a taxa de crescimento, susceptibilidade à infecção experimental e o efeito de endotoxinas.

Animais Livres de Germes Patogênicos Específicos (SPF)

Definição: são animais livres de microorganismos e parasitos específicos, porém não necessariamente livres de outros não-específicos.[1]

Também denominamos Animais Livres de Germes Patogênicos Específicos (*Specific Pathogen Free* – SPF), ou heteroxênicos, aqueles que não apresentam microbiota capaz de lhes determinar doenças, ou seja, albergam somente microorganismos não-patogênicos.

Sua criação é realizada em ambientes protegidos por barreiras sanitárias rigorosas, as quais podem ser resumidas do seguinte modo: cada vez que se entra nas áreas onde se encontram os animais, os técnicos devem tomar banho e utilizar uniforme esterilizado. Todo material a ser utilizado (peças do vestiário, ração, gaiolas, 'cama', água, bebedouro e outros) deve ser esterilizado, seja por meio de autoclavação, câmara com gás esterilizante ou por solução esterilizante em guichê de passagem de materiais. Sua criação também pode ocorrer dentro de isoladores.

Obtenção: animais SPF são obtidos e mantidos livres de contaminantes específicos (condições opostas dos animais FD, os quais são intencionalmente expostos a contaminantes específicos).

Para se estabelecer uma colônia de animais SPF, animais GF são infectados com flora conhecida e não-patogênica. Então, o animal SPF é alojado em um ambiente estéril, porém não necessitando mais de isoladores. Os materiais utilizados para sua criação e manutenção podem ser transferidos para ambientes estéreis, através de barreiras físicas e químicas.

A freqüente monitoração dos animais SPF é absolutamente necessária, para se ter certeza de que os contaminantes indesejáveis não se estabeleceram. A freqüência e a quantidade de amostras necessárias para essa avaliação devem ser padronizadas de acordo com a instituição. É necessário, no entanto, colher-se amostras ao acaso dos animais, materiais, equipamentos e do ambiente.

utilização: os animais SPF estão sendo cada vez mais utilizados, à medida que os pesquisadores necessitam de respostas mais confiáveis e seguras de seus experimentos.

Animais Convencionais

Definição: são animais que possuem microbiota indefinida por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas.

[1] Nomenclatura recomendada pelo Comitê Internacional de Animais de Laboratório, em 1964.

Sua criação apresenta apenas princípios básicos de higiene nos quais se procede somente à limpeza e desinfecção do ambiente e material utilizado. Quanto ao pessoal técnico, em geral, realiza-se apenas troca de uniforme (avental) para o trabalho com os animais.

Por causa da dificuldade de uma definição precisa de animais convencionais, muitos mal-entendidos têm surgido entre diferentes centros e fornecedores de equipamentos. O método para classificação desses animais consiste em definir que aqueles que não são *germfree*, Flora Definida, ou SPF, são arbitrariamente chamados de Convencionais.

Por definição própria, animais que não são espontaneamente infectados por alguns microorganismos patogênicos são considerados convencionais, ao passo que animais infectados com todos os microorganismos também são considerados convencionais. Dessa forma, temos alguns animais mais convencionais do que outros, embora ainda se ajustem aos limites da nossa definição.

Como problema prático, muitas vezes a escolha do grau convencional dos animais depende primariamente de dois fatores:

- origem dos animais;
- condições sob as quais os animais são mantidos durante a experiência.

Obviamente, o que se pretende fazer com os animais é a chave para o problema. Isto é, não faz sentido pedir-se animais SPF e colocá-los diretamente num ambiente altamente contaminado. O processo de receber os animais é também importante. Quarentena e testes são necessários quando os animais convencionais são recebidos, a menos que o investigador queira aceitar qualquer infecção que esses animais possam ter. Enquanto outra classificação ecológica requer sistemas especiais de estrutura física, o prédio para colônia de animais convencionais varia desde as possíveis barreiras sanitárias até espaços sem ventilação e iluminação. É claro que esses extremos do ambiente podem ser tolerados pelos animais convencionais porque estes já se encontram de alguma forma resistentes. A maioria dos animais usados em pesquisa, nos últimos 30 anos, tem sido convencional. Eles são relativamente mais baratos para se produzir e manter, são adequados propriamente a determinados experimentos e têm sido usados praticamente em todo tipo de pesquisa, desde a genética até a cirúrgica.

Referências Bibliográficas

GUSTAFSSON, B. Germ-free rearing of rats. *Acta Pathol Microbiol Scand* (Suppl), 77: 1-30, 1948.

POLLARD, M. Viral status of germ-free mice. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 20, 1966.

Bibliografia

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (CCAC). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO E APOIO TÉCNICO À EDUCAÇÃO (CEDATE). *Programação Arquitetônica de Biotérios*. Brasília: MEC, SG. Cedate, 1986.

DE LUCA, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.

PARROTT, R. F. & FESTING, M. F. W. *Standardised Laboratory Animals*. 1.ed. Department of Genetics Medical Research Council Laboratory Animals Centre Carshalton, 1971.

SABOURDY, M. *L'Animal de Laboratoire-dans la recherche biologique et médicale*. Paris: Presses Universitaires de France, 1967.

Saiz Moreno, L.; Garcia de Osma, J. L. & Compaire Fernandez, C. *Animales de Laboratorio: producción, manejo y control sanitario*. Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias/Ministerio da Agricultura, Pesca y Alimentación, 1983.

Simmons, M. L. & Brick, J. O. *The Laboratory Mouse: selection and management*. New Jersey: Prentice-Hall, 1970.

Trexler, P. C. & Renolds, L. I. Flexible film apparatus for the rearing and use of germ-free animals. *Appl. Microbiol*., 5:406-412, 1957.

Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw) *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 5th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1976.

Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao *Status* Genético

Belmira Ferreira dos Santos

Introdução

Os animais de laboratório podem ser classificados em dois grandes grupos: não-consangüíneos, *outbred* ou heterogênicos, e consangüíneos, *inbred* ou isogênicos. Aos *inbred,* foram acrescentados os híbridos, congênicos, mutantes e animais 'engenheirados', como, por exemplo, os transgênicos.

Animais Não-Consangüíneos ou *Outbred*

São animais que apresentam na constituição genética uma alta heterozigose (99%), o que faz com que seja mantida numa mesma colônia uma grande diversidade genética (vários alelos), possibilitando a reprodução de populações naturais.

Animais Consangüíneos ou *Inbred*

Um animal consangüíneo é o produto de 20 gerações consecutivas do acasalamento entre irmãos, ou pais e filhos. Utilizando esse tipo de acasalamento, conseguimos obter um índice de homozigose de 99%, o que torna tais animais os mais idênticos possíveis que se pode obter. Para cada 50 mil ou mais genes que um camundongo possui, 99% apresentam o mesmo alelo em dose dupla. Isso significa que cada linhagem consangüínea apresenta um conjunto único de características que as diferencia entre si. Esse conjunto de características, que constitui cada linhagem, é composto de genes que sofrem menor ou maior grau de influências ambientais. Por isso a manutenção dessas linhagens deve ser feita de maneira rigorosa, de modo que as variações, através das gerações, sejam mínimas.

A propagação de uma linhagem sempre tenta diminuir ao máximo a divergência genética, o que faz com que todos os animais mantidos em um biotério de criação estejam ligados a um ancestral comum por um intervalo mínimo de gerações.

O aparecimento desses animais ocorreu no começo do século XX, com os estudos de herança de cor em camundongos, realizados por Clarence C. Little. Após o surgimento da linhagem de camundongo denominada DBA, pesquisas em câncer fizeram surgir outras linhagens; as mais utilizadas até hoje datam dessa época. A maioria das linhagens se desenvolveu para tentar provar a existência de fatores genéticos que influenciassem a herdabilidade do câncer e a independência dos diversos tipos de câncer dentro de famílias.

Por meio da seleção feita durante o processo de construção das linhas consangüíneas, vários tipos de câncer surgiram, com freqüências previsíveis, e foram incorporados ao genoma dos animais. Quando as primeiras linhas se tornaram disponíveis e suas informações relatadas em publicações científicas, os pesquisadores descobriram que elas podiam ser muito úteis na pesquisa biomédica.

O uso de material biológico uniforme e confiável possibilitou que as únicas variáveis fossem aquelas que o pesquisador introduzisse, o que diminuía o número de animais usados e a necessidade de repetição do experimento.

Durante o desenvolvimento das linhas *inbred*, não só o estabelecimento de padrões de cores ou cânceres foi determinado, mas outras doenças constitucionais e estados patológicos análogos aos do homem foram se fixando, já que também eram influenciados por genes, o que tornou esses animais modelos únicos para o estudo de doenças humanas.

Com o surgimento das inúmeras linhagens, alguns pesquisadores se deram conta do potencial dos híbridos F_1 (produto do cruzamento entre duas linhagens consangüíneas), já que esses animais são geneticamente homogêneos e heterozigotos para aqueles pares de genes em que as linhagens parentais diferem entre si. Suas respostas são tão uniformes quanto às das linhagens consangüíneas e os animais são mais vigorosos, crescem mais rápido e sobrevivem mais tempo. Além disso, tais animais aceitam transplantes de tecidos de ambas as linhagens parentais.

Sistemas de Acasalamento

As características que constituem um indivíduo são de caráter genético e ambiental. Os investigadores que utilizam animais se preocupam com o controle de ambas as fontes de variação. Algumas das características ambientais podem ser controladas pela padronização do manejo e das instalações onde se encontram os animais. As características genéticas são controladas pelo sistema de acasalamento apropriado para a colônia.

O propósito de um sistema de acasalamento é preservar ou controlar as causas genéticas para determinada característica. Se tivermos uma população de tamanho infinito em condições ambientais específicas, o acasalamento ao acaso, sem a presença de seleção ou mutação, vai manter a média e a variação de todas as características quantitativas constantes. O *inbreeding* subdividirá essa população em subpopulações, nas quais a média aumentará ou diminuirá e a variação genética se reduzirá. O *outbreeding* (acasalamento entre diversas populações) fará a variação genética aumentar e mudará a média.

Acasalamentos seletivos de iguais aumentarão, diminuirão ou manterão constante a média, dependendo da direção da seleção adotada, e diminuirão a variação genética, sem necessariamente eliminá-la. Se, ao contrário, mantivermos o acasalamento entre animais os mais diferentes possíveis, a variação genética será grande.

A combinação da consangüinidade com sistemas de seleção deu aos geneticistas métodos de controle das características herdáveis dos animais de laboratório.

Acasalamento ao Acaso

Em princípio, o acasalamento ao acaso é aquele em que a chance de se acasalar um macho qualquer da população com uma fêmea qualquer da população seja igual para todos os animais. Em termos numéricos teríamos:

$$1/m \times 1/f = 1/mf$$

m = número de machos   f = número de fêmeas

Em grandes populações, o acasalamento ao acaso preserva os genes e as suas freqüências ao longo das gerações desde que não haja seleção ou mutações ocorrendo (Lei de Hardy-Weinberg).

Em populações finitas, o resultado obtido é um pouco diferente, já que haverá perda de alelos e fixação de outros, o que resultará em homozigose. A velocidade com que a homozigose se instala na colônia dependerá basicamente do número de unidades reprodutivas existentes, sendo inversamente proporcional a esse número.

Outro fator a considerar é que não se mantém populações de laboratório sem seleção, mutação ou variações ambientais, o que também resulta em variação gênica e de freqüências. Com base em tais fatos, vários sistemas de acasalamento ao acaso foram desenvolvidos para minimizar os efeitos da seleção e do ambiente. As mutações são impossíveis de serem evitadas.

Entre os sistemas desenvolvidos, o fator de importância é o número de animais que se quer manter em reprodução. Para colônias com 10 a 25 unidades reprodutivas, o sistema mais utilizado é o que evita ao máximo a consangüinidade (consangüinidade mínima), em que o princípio básico diz que cada macho acasalado contribui com um macho, e cada fêmea acasalada, com uma fêmea, para a geração seguinte. Para que esse sistema possa ser posto em prática, todos os animais devem ser acasalados ao mesmo tempo, não havendo, assim, sobreposição de gerações. Esse método mantém a consangüinidade em menos de 1%.

Para colônias, onde o número de unidades reprodutivas é de 25 a 100, o sistema mais utilizado é o rotacional. O principal objetivo é o de evitar o acasalamento de parentes próximos e assegurar que a próxima geração venha de um espectro mais amplo de pais do que ocorreria se fosse ao acaso. Sem esses sistemas poderíamos selecionar inadvertidamente matrizes de somente um pequeno segmento da população, limitando e alterando a sua freqüência gênica ao longo das gerações.

Tais métodos são empregados onde existe uma contínua substituição das colônias sem distinção entre as gerações. A colônia é subdividida em grupos e os acasalamentos são arranjados entre estes de maneira sistemática. A escolha dos animais para o acasalamento é feita dentro do grupo, seguindo critérios próprios a cada colônia. Temos vários exemplos de sistemas rotacionais, dentre os quais podemos destacar dois:

Método Poiley

A colônia é subdividida de 3 a 12 grupos e quanto menor o número de unidades reprodutivas, maior o número de grupos formados. Os acasalamentos seguem esquemas predefinidos e podem ser realizados de acordo com as necessidades de reposição de cada grupo.

Exemplo:

Fêmea	GRUPO A FORMAR	Macho
1	3	2
2	1	3
3	2	1

Método Falconer

É também um sistema rotacional, em que a colônia é subdividida em grupos e, em vez de embaralharmos os novos grupos a serem formados, fixamos um dos sexos e rotacionamos o outro.

Exemplo:

Fêmea	GRUPO A FORMAR	Macho
1	1	2
2	2	3
3	3	1

Para colônias em que o número de unidades reprodutivas é superior a 100, o sistema recomendado é o método ao acaso. Os animais são escolhidos ao acaso, de toda a colônia, e seu parentesco não é observado. A desvantagem é que alguns animais aparentados podem ser acasalados, mas como a colônia é muito grande, o seu índice de homozigose não se eleva rapidamente.

Acasalamento Consangüíneo

O sistema de acasalamento de irmãos da mesma ninhada é o mais fácil para a manutenção das características da linhagem consangüínea. Entretanto, animais com características individuais podem ser selecionados para acasalamento, a fim de fixarmos essas características na linhagem, ou quando estamos desenvolvendo uma nova linhagem.

Partindo-se de um único casal, representante da linhagem escolhida, acasalamos todos os irmãos, de todas as ninhadas. À medida que a colônia cresce, começamos a selecionar quais os melhores casais e passamos a só acasalar irmãos de ninhadas provenientes desses casais. A colônia cresce até o máximo de 20 casais e, a partir daí, só fazemos a reposição de casais quando ocorre descarte zootécnico ou morte.

Após três gerações consecutivas, escolhe-se um novo casal para rederivar a colônia, de maneira que possamos traçar uma única linha no *pedigree* dos casais atuais até o casal ancestral comum. Com esse cuidado, evita-se o distanciamento dos animais em reprodução com o ancestral comum mais próximo e evita-se também que a colônia de fundação tenha animais de várias gerações distintas concomitantemente.

Como se pode concluir, após o estabelecimento de uma linhagem consangüínea, para que a homozigose continue através das gerações, os reprodutores devem ser acasalados indefinidamente, entre irmãos ou pais e filhos, e essa é a razão para que as colônias de fundação de uma linha consangüínea tenham um reduzido número de casais, já que um maior número de reprodutores significaria maior chance de fixação de mutações que porventura ocorressem durante a manutenção dessas colônias.

Mutantes

As linhagens *inbred* podem se manter indefinidamente, desde que as regras de acasalamento entre irmãos sejam seguidas. O único problema são as mutações naturais que ocorrem espontaneamente ao longo do genoma. Independentemente do *background* genético onde a mutação tenha ocorrido, é sempre interessante trazê-la para uma linhagem consangüínea, a fim de comparar os efeitos do alelo mutante sem a interferência de outras combinações gênicas. Isso pode ser feito por três sistemas de acasalamento específicos:

Backcross – se a mutação for dominante ou se a mutação for recessiva e o homozigoto recessivo for inviável ou infértil.

Seleciona-se uma linhagem *inbred* para onde se vai transferir a mutação. O animal mutante é acasalado com um animal *inbred* e seu produto é acasalado com a linhagem *inbred*. O produto desse acasalamento também é acasalado com a linhagem *inbred* e assim se sucedem as gerações.

Após a sétima ou oitava geração, podemos começar o acasalamento entre irmãos, até 20 gerações, para o estabelecimento de uma nova linhagem. Se a mutação recessiva for inviável, somente os heterozigotos sobreviverão e teremos de testar os animais para identificar quem é homozigoto com o alelo viável (linhagem *inbred* parental) e quem é heterozigoto.

Os acasalamentos podem ser feitos entre dois heterozigotos ou entre heterozigoto e a linhagem *inbred* parental. Se o homozigoto recessivo for infértil, o procedimento de acasalamento é o mesmo descrito anteriormente, somente tendo-se o cuidado de testar todos os três tipos de animais produzidos para não perdermos tempo acasalando animais inférteis. Esses cuidados tornam-se necessários quando não se consegue distinguir fenotipicamente os mutantes recessivos.

Cross-Intercross – se a mutação for recessiva.

Os animais homozigotos recessivos mutantes são acasalados com um animal *inbred* de uma linhagem selecionada. Sua progênie, heterozigota, é acasalada entre si para que possamos recuperar o mutante em

homozigose. Esses mutantes homozigotos são usados para um novo acasalamento com um animal *inbred* da linhagem selecionada.

Os ciclos de dois acasalamentos são realizados por oito vezes, quando então o índice de homozigose da nova linhagem formada estará em 99%, se houve um *linkage* fraco; ou 23 vezes, para alcançarmos 99% de homozigose na nova linhagem, se o *linkage* for forte.

Cross-Backcross-Intercross – se a mutação for recessiva.

Os animais homozigotos recessivos mutantes são acasalados com um animal *inbred* de uma linhagem selecionada e o produto acasalado com a linhagem *inbred* parental. Os produtos são acasalados entre si e o homozigoto recessivo mutante, depois de identificado, é acasalado com a linhagem *inbred* parental. Quatro ciclos de três acasalamentos são suficientes para elevar o índice de homozigose da nova linhagem até 99% se o *linkage* for fraco, mas se o *linkage* for forte, serão necessários 23 ciclos.

As linhagens *inbred* têm contribuído sobremaneira no estudo da resposta humoral e na oncologia, assim como têm ajudado a elucidar o componente genético de várias doenças como a obesidade, o diabetes etc. Esses animais tiveram um incremento em sua criação a partir da Segunda Guerra Mundial, quando o estudo dos efeitos das radiações passou a ser mais estudado. Muitos camundongos consangüíneos foram submetidos a irradiações e depois acasalados.

Os mutantes resultantes desses acasalamentos foram selecionados e reacasalados com representantes da linhagem parental ou de outras linhagens, constituindo as linhas congênicas, que, por definição, diferem da linhagem original apenas pelo par de genes introduzidos. Na realidade, o que é introduzido no novo *background* é uma pequena porção do cromossomo, onde se encontra o gene 'importado'. Quando a mutação se dá por processos de seleção natural, dizemos que a linhagem é coisogênica. Com isso, um enorme passo foi dado, pois alelos existentes em uma linhagem ou criados por mutagênese (irradiações ou substâncias químicas) poderiam ser transferidos para todos os *backgrounds* existentes, o que permitiu estudar o efeito daquele alelo em diferentes ambientes gênicos. O estudo dos genes do complexo de histocompatibilidade, que regulam a resposta imune, muito se beneficiou e se desenvolveu com isso. Atualmente, a maioria das linhagens congênicas existentes tem sua origem em linhagens cujo gene 'importado' pertencia a esse complexo.

Híbridos

São animais provenientes do acasalamento entre duas linhagens *inbred*. Isso é feito quando se quer obter animais heterozigotos para determinado par de alelos que se quer estudar. Utiliza-se duas linhagens que sabidamente possuem alelos diferentes para o gene em questão. Os animais produzidos são mais vigorosos e a prole costuma ser mais numerosa. O inconveniente é que esses animais só podem ser reproduzidos a partir do cruzamento de linhagens consangüíneas, o que nos obriga a mantê-las para poder produzir os híbridos de interesse.

Linhagens *Inbred* Recombinantes

São animais derivados pelo acasalamento ao acaso dos híbridos e, então, continuamente acasalados entre irmãos por 20 gerações consecutivas para a formação de novas linhagens consangüíneas.

Animais Transgênicos

Animais que carregam incorporado, em seu genoma, um segmento de DNA de outra espécie.

Métodos de Acasalamento

Acasalamento Monogâmico

Neste tipo de acasalamento, mantém-se um macho para uma fêmea, na gaiola, em caráter permanente. As vantagens desse método são o aproveitamento do cio pós-parto, registros melhores e mais detalhados, levantamento de índices mais acurados – já que os animais são identificados individualmente – e ninhadas mais homogêneas. A principal desvantagem é a necessidade de maior número de gaiolas e de espaço para a produção dos animais.

Acasalamento Poligâmico (harém)

Neste acasalamento, mantém-se um macho para duas ou mais fêmeas. Pode ter caráter permanente ou temporário. No primeiro caso, as fêmeas grávidas são retiradas para gaiolas-maternidade e após o desmame da ninhada retornam para a gaiola do mesmo macho. Nesse sistema, precisamos de um grande número de gaiolas, já que as fêmeas de um harém não podem ser misturadas com as de outro.

No segundo caso, todas as fêmeas grávidas são retiradas e colocadas em gaiolas-maternidade, independentemente da sua procedência. Após o desmame da ninhada, as fêmeas retornam para haréns onde haja disponibilidade de vagas. Nesse caso, o número de gaiolas-maternidade se reduz, mas os registros se tornam menos precisos.

Bibliografia

Foster, H.; Small, D. & Fox, G. (Eds.). *The Mouse in Biomedical Research*. New York: Academic Press, 1983.

Green, E. H. *The Biology of Laboratory Mouse*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1966.

The Jackson Laboratory. *Handbook on Genetically Standardized JAX Mice*. 5th ed. Bar Harbor: The Jackson Laboratory, 1997.

Criação e Manejo de Cobaias

Sebastião Enes Reis Couto

Origem

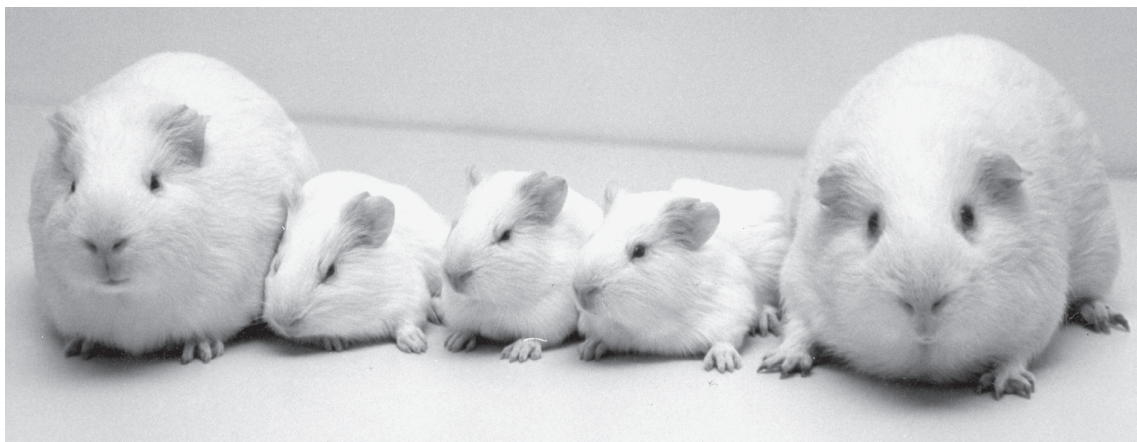
A cobaia, coelhinho, porquinho da Índia ou *Cavia porcellus*, é um animal muito versátil que tem servido ao homem de muitas maneiras (na alimentação e na pesquisa). Os antepassados desses animais, que são hoje utilizados no mundo inteiro com a finalidade de investigação e de domesticação, são provenientes da América do Sul. Não se sabe, porém, o período exato que esse roedor foi levado para a Europa e para todo o continente americano.

Wagner & Manning (1976) descreveram e deram algumas referências sobre a transformação desse roedor nativo em animal de laboratório. De forma sucinta, tais animais foram vistos pela primeira vez pelos espanhóis no Peru, no início do século XVII, e levados por marinheiros para a Europa com o propósito de domesticação e exposição. Anos depois, sendo aproveitados como animais de laboratório, foram os primeiros a ser utilizados na tentativa de obter animais livres de germes, por meio de cesárias assépticas, por Nuttal e Thierfelder (1895) na Alemanha. A escolha se deu em virtude da maturidade de seus filhotes ao nascer. Com o auxílio de um complicado isolador, conseguiram manter cobaias por mais de 10 dias livres de microorganismos, porém, não se desenvolveram. Reyniers (1946) obteve com sucesso a produção desses animais livres de germes em isoladores mais adequados. Cepas consangüíneas de cobaias foram obtidas a partir de 1906 e contribuíram grandemente para a compreensão da genética e da reprodução.

Importância na Experimentação Biológica

A cobaia é conhecida, por muitos, como símbolo representativo dos animais de laboratório. As primeiras utilizações, com fins experimentais, foram realizadas por Lavoiser, em 1790, em investigações relacionadas ao calor. Atualmente, as cobaias são muito utilizadas em experimentações ligadas à nutrição, farmacologia, imunologia, alergia, radiologia etc. É o animal de eleição para obter 'complemento' necessário em muitas reações imunológicas denominadas, em geral, de 'fixação do complemento', entre as quais se destaca a clássica reação de Wassermann, empregada para o diagnóstico clínico e para isolar *Mycobacterium tuberculosis*, variedade *hominis*, e na demonstração de carência por vitamina C. Esses animais são bastante utilizados nos testes de reativos biológicos.

POSIÇÃO TAXONÔMICA

- Classe: Mamífera
- Ordem: Rodentia
- Família: Cavidae
- Gênero: *Cavia*
- Espécie: *Porcellus*

Cavia porcellus. Variedade inglesa.
Fonte: Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz.

Wagner & Manning (1976) descreveram as diferentes espécies do gênero *Cavia* que são encontrados predominantemente em determinadas regiões da América do Sul. Na Argentina, no Uruguai e no Brasil são encontrados *Cavia aperea*, enquanto no Peru é encontrada *Cavia cutleri*. Festing (1976) considerou que *Cavia porcellus* é derivada de *Cavia aperea*, e *Cavia cutleri* e *Cavia rufescens* são, na realidade, formas de *Cavia aperea*.

As variedades de *Cavia porcellus* são identificadas pelo tamanho e pela direção dos pêlos. A variedade inglesa (Dunkin – Hartley) apresenta pêlo curto (*short hair*), liso e macio. É a variedade mais comum e aparentemente a mais bem adaptada e utilizada em pesquisas.

A variedade abissínia, que apareceu na Inglaterra, é uma mutante de pêlos curtos e ásperos que crescem em redemoinho ou 'rosetas', enquanto a variedade peruana é uma mutante de pêlos longos e sedosos. Raramente são utilizadas em pesquisa e se mantiveram, quase exclusivamente, para fins de domesticação e de exposição. A cepa iniciada por Dunkin e Hartley, em 1926, é a estirpe progenitora de muitas cobaias; deu grande contribuição para a compreensão da genética e para a reprodução da espécie.

COMPORTAMENTO

As cobaias são animais sociais, tímidos, dóceis e raramente mordem ou arranham. Assustam-se facilmente, defecam e urinam nos comedouros e derramam sua alimentação pelo piso da gaiola. Gritam de prazer antes de situações gratificantes (alimentação) e ficam muito juntas ou em cima umas das outras durante o manejo da colônia pelo técnico.

Os animais adultos, freqüentemente, mordem as orelhas dos jovens e os machos podem brigar violentamente, principalmente durante disputas por uma fêmea em estro, até que se estabeleça a hierarquia do grupo.

Outra característica marcante das cobaias é a de que são extremamente susceptíveis a estímulos estressantes, sobretudo a alterações ambientais. Simples modificações na ração, no comedouro, na água e no bebedouro podem levar os animais a recusar o alimento. Além disso, estímulos como barulho intenso ou movimentos bruscos assustam os animais, que passam a correr de um lado para o outro, provocando ferimentos entre eles. Ocasionalmente, durante a contenção para a troca de gaiolas, podemos observar paralisação do animal por vários minutos e até mesmo a morte. Isso implica dizer que o trabalho com essa espécie deve ser realizado com muito cuidado, principalmente no que se refere às fêmeas grávidas ou aos recém-nascidos, os quais podem ser pisoteados pelos outros animais do grupo.

As cobaias são muito sensíveis à toxicidade por vários antibióticos, tais como tetraciclina, penicilina e cloranfenicol.

Principais Características Anatômicas e Fisiológicas

A cobaia é um roedor de estatura baixa e com o corpo arredondado e sem cauda. São animais de olhos salientes, vivos, brilhantes, pretos ou transparentes (albinos) e de orelhas pequenas, largas e dobradas. Os machos são mais corpulentos que as fêmeas, exceto durante a gravidez. Tanto os machos como as fêmeas possuem um par de glândulas mamárias abdominais. A fórmula dentária para animais adultos é a seguinte: incisivos 1/1, caninos 0/0, pré-molares 1/1 e molares 3/3. Têm um total de 20 dentes permanentes sem raiz e com crescimento contínuo.

Possuem quatro dedos nas patas anteriores e três nas posteriores. Os eritrócitos das cobaias são menos frágeis em soluções eletrolíticas. A protrombina apresenta um longo tempo para sua conversão em comparação com a maioria das espécies. Tem escassa produção de tromboplastina no pulmão. As fêmeas de idade avançada são excelentes fontes de complemento, usado freqüentemente para os ensaios sorológicos. O sistema linfático é bem desenvolvido e os gânglios da região ventral da cabeça e do pescoço são facilmente acessíveis para fins exploratórios e também mais afetados por abscessos bacterianos. A temperatura retal situa-se, em média, em torno de 38,5 °C.

Nutrição

As cobaias são fundamentalmente herbívoras e comem a maioria dos tipos de grãos, verduras e pasto. As rações comerciais são peletizadas, com diâmetro recomendável de no máximo de 50 mm, e devem ser administradas em comedouros adequados para minimizar o desperdício, contaminação fecal e urinária. O consumo médio diário de ração comercial peletizada pelos animais adultos é de 40 g. As cobaias, do mesmo modo que primatas não-humanos e o próprio homem, são dependentes de fontes exógenas de ácido ascórbico. A deficiência de ácido ascórbico na alimentação das cobaias é responsável pelo aparecimento de sinais e sintomas característicos que começam com a redução no consumo de alimento e perda de peso, seguidas por anemia e hemorragia generalizada. Em razão dessas alterações, ou de infecções bacterianas secundárias, a morte sobrevém em 3 a 4 semanas (National Research Council, 1978).

A incapacidade para sintetizar o ácido ascórbico é atribuída a uma deficiência, de origem genética, da enzima hepática gluconolactona – oxidase necessária para produzir ácido L-ascórbico que, em outros animais, procede da D-glucosa. O conteúdo de vitamina C nos alimentos, em forma de *pellets*, reduz-se com o período de fabricação e armazenamento.

As rações com mais de 90 dias de fabricação podem não conter quantidade suficiente de vitamina C para manter os animais em bom estado de saúde. A suplementação de vitamina C, através de vegetais verdes, na

quantidade de 50 a 100 g/dia/animal, tem sido bastante utilizada. Porém, essa suplementação deve ser vista com restrições, em virtude de fatores desconhecidos que podem favorecer a contaminação dos animais pela dificuldade do controle da fonte produtora e da eliminação de agentes patogênicos.

Tem sido difícil determinar a quantidade de vitamina C exata por animal, pois dependem da sua condição fisiológica. É sugerida a quantidade diária de 10 mg/kg para manutenção de animais e de 30 mg/kg para fêmeas grávidas. Recomendamos a suplementação de vitamina C em água na proporção de 300 mg/litro. Deve ser preparada diariamente, por ser tratar de uma de vitamina termolábil.

Os bebedouros, em geral, são fabricados de material plástico com capacidade de 1 litro, equipados com bicos de aço inox e colocados do lado de fora das gaiolas, evitando, assim, o derramamento de água em seu interior.

Tabela 1 – Necessidades nutricionais para cobaias (concentração na dieta)

NUTRIENTE	UNIDADE	NECESSIDADE
Proteína (cresc.)	%	18
Ácido linoleico	%	1
Energia Total	Kcal/g	3
Fibra	%	10
MINERAIS		
Cálcio	%	0.9
Magnésio	%	0.2
Fósforo	%	0.6
Potássio	%	1.0
Cobre	%	6.0
Iodo	%	1.0
Ferro	%	50.0
Manganês	%	40.0
Zinco	%	20.0
Cromo	%	0.6
Selênio	%	0.1
VITAMINAS		
A	Mg/kg	7.0
D	UI/kg	1000.0
E	Mg/kg	50.0
K	Mg/kg	5.0
C	Mg/kg	200.0
Biotina	Mg/kg	0.3
Colina	Mg/kg	1000.0
Acido Fólico	Mg/kg	4.0
Niacina	Mg/kg	10.0
Pantotênico	Mg/kg	20.0
Riboflavina	Mg/kg	3.0
Tiamina	Mg/kg	2.0
Piridoxina	Mg/kg	3.0
Cianocobalamina	Ug/kg	10.0

Fonte: *Nutrient Requirements of Laboratory Animals* (1978).

Sistema de Reprodução

A cobaia é um animal poliéstrico. O estro dura menos da metade de um dia e o ciclo estral completo tem a duração de 13 a 25 dias (em média 16 dias).

O número médio de filhotes por ninhada é 2, variando de 1 a 8. Período de gestação: cerca de 59 a 72 dias ou média de 63 dias, ou seja, longo para um animal tão pequeno.

A ovulação é espontânea e o corpo lúteo é funcional, em contraste com a condição encontrada em todos os outros roedores que foram investigados.

A época da puberdade situa-se aproximadamente entre 55 e 70 dias de idade, em condições normais de manejo. Se alimentados com rações mais ricas do que a usual, há maior desenvolvimento do animal e a puberdade pode ocorrer entre 45 a 60 dias. Uma série de trabalhos enuncia como idade média do aparecimento do primeiro cio aproximadamente 67,8 dias de idade, mais ou menos dois dias, com desvio-padrão de 21,5 dias, com variação de 33 a 134 dias.

A idade média da ruptura da membrana que fecha a vagina se dá em torno de 58,2 dias. O intervalo entre a primeira ruptura e o primeiro cio vai de 0 a 4 dias.

O cio começa freqüentemente ao anoitecer. O proestro, onde se nota congestão e tumefação dos genitais externos e uma ligeira descarga serosa da vagina, usualmente dura 24 a 36 horas. O cio onde há receptividade sexual dura de 6 a 11 horas em 90% dos casos.

A ovulação ocorre usualmente 10 horas após o começo do cio ou da receptividade sexual. Cerca de 64% de todos os períodos de cio começam entre 18 horas a 6 horas.

O cio ocorre imediatamente depois do parto em cerca 64% das fêmeas. Usualmente, ele começa duas horas após o fim do parto. Algumas fêmeas apresentam ovulação após o parto, sem sinais de cio.

Uma fecundação bem-sucedida é indicada pela expulsão do tampão vaginal, uma substância branca e serosa, com cerca de 2,5 cm de comprimento proveniente da coagulação do líquido seminal que aparece 24-48 horas após o acasalamento. O tampão escurece rapidamente e, então, muitas vezes não é possível distingui-lo no meio das fezes no fundo da gaiola. Ele pode nos indicar com precisão o tempo da gestação ou o momento próximo do parto, pois sua presença garante 80% da fecundação da fêmea.

Os filhotes já nascem recobertos de pêlos, com os olhos abertos e a dentição completa, o que lhes confere precocidade e auto-suficiência, uma vez que já podem consumir alimentos sólidos (3-5 dias de idade). O leite materno ainda é fundamental aos neonatos para a proteção contra doenças infecciosas. Desse modo, o desmame pode ser feito aos 14 dias, mas a melhor indicação é de que ocorra quando os animais apresentem 21 dias de idade. O reconhecimento dos filhotes pela mãe pode ser feito a distância, porém não deixam de amamentar os filhotes de outras fêmeas, desde que sejam do mesmo grupo de convivência. O peso dos filhotes ao nascer fica entre 80 a 100 gramas.

Sistema de Acasalamento

A escolha dos animais para acasalamento deve ser cuidadosa. Além de selecionar machos e fêmeas jovens, fortes e saudáveis, devemos ter o cuidado de escolher criteriosamente pelos seus valores genéticos (ver controle da consangüinidade da colônia).

O acasalamento pode ser realizado quando as fêmeas tiverem aproximadamente três meses de idade (400 g - 500 g) e os machos quatro meses (500 g - 600 g), mas acasalamentos férteis são observados entre animais de 8 a 10 semanas.

O primeiro parto deve ocorrer antes dos 6 meses de idade. Depois desse tempo, a sínfise púbica (articulações da pélvis-anel pélvico) tende a se soldar mais firmemente por um processo de calcificação, produzindo estreitamento mecânico do canal de nascimento que resultará em partos distórcicos.

Os acasalamentos podem ser monogâmicos e poligâmicos permanentes. O acasalamento monogâmico é um sistema que compreende um macho e uma fêmea acasalados durante toda a vida reprodutiva. Tem a vantagem da fácil identificação dos filhotes e a manutenção de registro fidedigno, elevada porcentagem de cio férteis pós-partos, de filhotes desmamados, maior controle das enfermidades, boa seleção dos reprodutores e é amplamente utilizado em colônias consangüíneas onde empregam acasalamento entre irmãos. As desvantagens são o aumento de mão-de-obra, necessidade de grande número de machos reprodutores, de espaços maiores e de mais pessoal.

O acasalamento poligâmico é um sistema que compreende 1 macho para um grupo de 5 a 12 fêmeas respeitando o espaço mínimo por animal (1200 cm^2). Recomendamos 1 macho para cada 5 fêmeas com gaiolas de 100 cm de comprimento, 70 cm de largura e 30 cm de altura, fabricada em plástico e autoclavável. Esse sistema é o mais utilizado na maioria das colônias de grande produção. A vantagem dele consiste em ter o maior número de animais produzidos em menos espaço. Tem como desvantagem a dificuldade para o registro dos animais e a identificação da fêmea e do macho não-férteis.

Os reprodutores são mantidos na colônia até a idade de 24 a 30 meses.

Desmame e Sexagem

Independente do sistema de produção, os filhotes devem ser desmamados com três semanas de idade. O melhor critério quando não existe registro, é provavelmente quando alcançam mais 180 g de peso. Os animais devem ser separados por sexo e tamanho. Tanto os machos quanto as fêmeas apresentam o orifício genital em igual distância do ânus. Nos machos, esta área é ligeiramente arredondada com sulco único e contínuo entre a abertura da uretra e o ânus, enquanto nas fêmeas esse sulco é interrompido pela membrana vaginal, exceto durante o estro ou no término da gravidez. Nos machos, os testículos podem ser palpados e o pênis pode ser exteriorizado facilmente mediante uma pressão na região inguinal.

Controle da Consangüinidade na Colônia

Animais consangüíneos – *inbred* – são obtidos pelo acasalamento entre irmãos, e/ou pais e filhos, durante 20 ou mais gerações consecutivas. Os estudos genéticos em relação as cobaias foi iniciado em 1906 pela Animal Husbandry Division of the U.S. Bureau of Animal Industry. Este estudo foi complementado por Wright a partir de 1915. Desde então, consta de 35 cepas *inbred* destinadas principalmente ao estudo do câncer.

Animais não-consangüíneos – *outbred* – são animais que apresentam constituição genética variada, em estado de heterozigose, a qual deve ser conhecida e mantida. O emprego do sistema de acasalamento rotacional visa a manter animais heterozigotos, evitando o acasalamento de parentes próximos e assegurando que a geração seguinte venha de um maior número de pais do que o que ocorreria se fosse ao acaso. Ao empregar esse sistema, a colônia se desenvolve em vários grupos de igual número, de modo que a quantidade de fêmeas e machos em todos os grupos é sempre igual. O número de grupos de uma colônia está relacionado a seu tamanho (número de reprodutores). Quanto menor a colônia, maior o número de grupos.

Em colônia de criação e produção de cobaias, utilizamos um sistema de acasalamento similar ao rotacional (Método Poiley). Por exemplo:

Suponhamos que a colônia consista de 510 fêmeas e 102 machos, com gaiolas para cada unidade reprodutiva (5 fêmeas x 1 macho), numeradas de forma que identifique os grupos e as unidades reprodutivas. E que essa colônia esteja dividida em 6 grupos, onde cada grupo é constituído de 85 fêmeas e 17 machos. Recomendamos

ainda, para cada grupo, reserva de animais jovens para substituição anual de 50% dos reprodutores da colônia, retirados de cada unidade reprodutiva três meses antes, para crescimento e observação dos futuros reprodutores. Sabendo-se que o ciclo de acasalamento (período reprodutivo dos reprodutores) varia entre 2 a 3 anos de idade.

Quadro 1 – Esquema sobre como os acasalamentos serão efetuados

Formação do grupo	=	Macho do grupo	x	Fêmea do grupo
1	=	3		6
2	=	6		1
3	=	5		2
4	=	1		3
5	=	2		4
6	=	4		5

Produção Mensal Estimada em uma Colônia com 510 Fêmeas e 102 Machos Reprodutores

Sabendo-se:

Período médio de gestação = 63 dias
Número médio de filhotes/parto = 2,75
Taxa de mortalidade de lactente = 10%
Número de filhotes desmamados/parto = 2,5
Desmame = 21 dias de idade
Acasalamento = média de 90 dias de idade
Intervalo entre partos = 63 dias de gestação
16 dias de ciclo estral
79 dias

365 dias (ano): 79 dias (intervalo) = 4,6 partos/ano.

OBS.: aproximadamente 5 partos, devido a um número significativo de fêmeas fecundadas imediatamente após o parto.

5 partos x 2,5 filhotes = 12,5 filhotes desmamados/ano/fêmea
12,5 desmamados/ano x 510 fêmeas = 6.375 desmamados/ano
ou seja, 531,25 desmamados/mês.

Para fins de cálculo de produção, consideramos o índice reprodutivo igual a 1 filhote/fêmea/mês. Dos filhotes nascidos e/ou desmamados, 50% são fêmeas e 50% machos. Sabendo-se que em cada período de 24 meses o número de reprodutores (machos e fêmeas) são substituídos em 100%. Mensalmente, são substituídos 1:24 fêmeas = 21,25 e 1:24 machos = 4,25.

Considerando que a taxa de mortalidade dos reprodutores e animais em crescimento seja 3%, necessitamos de reserva mensal de 22 fêmeas e 5 machos de filhotes desmamados para futuros reprodutores.

Identificação dos Animais e Registro da Colônia de Cobaia

É necessário contar com um bom método de identificação dos animais para garantir um registro fidedigno da colônia.

O método mais satisfatório é mediante a tatuagem individual nas orelhas, usando uma pinça de tamanho apropriado. E em cada orelha se pode ter três letras ou números.

Aplicação de corantes tais como a solução de ácido pícrico (amarelo), embora eficiente, é de curta duração e deve ser periodicamente renovada. Os registros dos eventos ocorridos com os animais, nas respectivas fichas de identificação da unidade reprodutiva ou em livro, devem conter informações suficientes para que se tenha, a cada momento, uma posição exata de tudo o que acontece na colônia, como: data do acasalamento, nascimento, quantidade de filhotes nascidos, mortos, desmame, variações ambientais etc.

Contenção

O método mais seguro para conter uma cobaia é colocar uma mão sob o tórax e com a outra apoiar a parte posterior, para suportar o peso do animal, permitindo que ele fique sentado sobre a palma da mão. Deve-se evitar apertar o tórax pela sua fragilidade.

Os anestésicos devem ser utilizados sempre que necessário, obtendo-se maior facilidade e tempo de manipulação do animal.

Quadro 2 – Medicação pré-anestésica para cobaias

DROGA	DOSAGEM	VIA	EFEITO
Atropina	0,03 – 0,05 mg/kg	S.C.	tranqüilizante por 30 min.
Diazepan	5,0 mg/kg	I.P.	tranqüilizante, mas não produz analgesia
Diazepan + Ketamina	0,1 mg 44 mg/kg	I.M.	rápida imobilização e bom relaxamento muscular
Ketamina	25 a 44 mg/kg	I.M	Tranqüilizante

Fonte: *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (1984).

Quadro 3 – Anestésicos injetáveis para cobaias (hipnótico/sedativo)

DROGA	DOSAGEM	VIA	EFEITO
Fentanyl/droperidol (innovar – vet)	22-88 ml / kg	I.M.	Tranqüilizante anestesia
Ketamina HCl + Promazine HCl + Aminopentamide Sulphate (Ketaset Plus-Bristol)	100 mg / ml 7,5 mg / ml 0,0625 mg / ml 125 mg / kg	I.M.	Anestesia
Pentobarbital	30 a 40 mg / kg	I.P. ou I.V.	Anestesia
Thiopental	55 mg / kg	I.P. ou I.V.	Anestesia

Fonte: *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (1984).

Os anestésicos por inalação, em particular o metoxiflurano, são agentes de escolha para anestesia em cobaia. O éter é, ainda, freqüentemente usado como relaxante muscular e analgésico, sempre associado à atropina para conter a excessiva salivação.

Referências Bibliográficas

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

Festing, M. F. W. The guinea pig. In: Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw) *The Ufaw Handbook on the Care and Managementn of Laboratory Animals*. 5th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1976.

National Research Council. Nutrient requirements of the guinea pig. In: ___ . *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. 3rd ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1978.

Nuttall, G. H. F. & Thierfelder, H. Thierisches leben ohne bakterien im verdauungekanal. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem*., 21:109-121, 1895.

Reyniers, J. A. Germfree life applied to nutrition studies. *Lobund Rep*., 1:867-120, 1946.

Wagner, J. E. & Manning, P. J. *The Biology of the Guinea Pig*. New York: Academic Press, 1976.

Bibliografia

De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Dunkin, G. W. et al. Comparative biometric study of albino and coloured guinea-pigs from the point of view of their suitability for experimental use. *J. Hyg., Camb.*, 30:311-330, 1930.

Menéndez, R. C. *Animales de Laboratorio en Las Investigaciones Biomedicas*. Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1985.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). *Temas Seleccionados sobre Medicina de Animales de Laboratório: el cobayo.* Rio de Janeiro: CPFA/OPS/OMS, 1976. (Serie Monografias Cientificas y Tecnicas)

Phillips, B. P. & Wolfe, P. A. The use of germfree guinea pigs in studies on the microbial interrelation ships in amebiasis. *National Academy of Sciences.* Washington, D. C., 78:308-314, 1959.

Poiley, S. M. A Systematic Method of Breeder Rotation for Nom-Inbred Laboratory Animal Colonies. *Proceeding of The Animals Care Panel*, 10(4):159-166, 1960.

Saiz Moreno, L.; Garcia de Osma, J. L. & Compaire Fernandez, C. *Animales de Laboratorio: producción, manejo y control sanitario.* Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias/Ministerio da Agricultura, Pesca y Alimentación, 1983.

Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 5th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1976.

Wright, S. The albino series of allelomorphs in guinea-pigs. *The American Naturalist*, 49:140-147, 1915.

11

Principais Doenças das Cobaias

Andréa Mendes Pereira

Doenças Infecciosas de Origem Bacteriana

Linfadenite Cervical Enzoótica

É uma doença supurativa encontrada com certa freqüência em colônias de cobaias, cujo agente etiológico é *Streptococcus zooepidemicus*. É uma zoonose.

As fêmeas parecem ser mais susceptíveis que os machos, havendo aparentemente alguma diferença também entre as cepas.

O agente invade o organismo através de solução de continuidade na mucosa oral, e algumas enzootias foram atribuídas a injúrias orais durante a ingestão de forragem. Outras vias de infecção sugeridas compreendem: abrasões de pele, através do trato respiratório por secreções nasofaríngeas, canal do parto e via conjuntival.

A doença se manifesta clinicamente por lesões supuradas ou em forma de tumorações, localizadas inferiormente na mandíbula ou na região do pescoço.

Ocorre aumento gradativo de tamanho e formação de abscessos nos linfonodos afetados e geralmente, mas nem sempre, há depreciação severa dos animais afetados. A ruptura ou drenagem cirúrgica é seguida de cicatrização com formação de tecido de granulação, mas a forma septicêmica da doença pode ocorrer em epizootias com alta mortalidade. Como seqüela da doença aguda, podem suceder peritonite, necrose hepática focal, otite média purulenta, pericardite fibrinosa e pleuropneumonia.

Na necropsia, os linfonodos afetados contêm abscessos bem encapsulados, repletos de pus espesso, inodoro, de cor branca amarelada. Na forma disseminada, outros linfonodos estão afetados, assim como podem estar presentes pleuropneumonia, miocardite, pericardite e peritonite fibrinopurulenta.

Relata-se também otite média, nefrite, artrite e celulite. Microscopicamente, observa-se inflamação supurativa necrótica com destruição do linfonodo, em cuja periferia são facilmente demonstráveis cadeias de cocos gram-positivos.

O diagnóstico definitivo depende do isolamento e identificação do germe. É importante ressaltar que outros linfonodos podem estar afetados por este agente, assim como outros agentes podem causar tumefações cervicais, tais como: *Streptobacillus moniliformis, Yersinia pseudotuberculosis, Salmonella* spp, *Fusobacterium necrophorum,* ficomicetas e vírus tipo C da leucemia de cobaia.

Os animais doentes devem ser removidos da colônia e as carcaças devem ser destruídas ou tratadas separadamente, evitando-se assim a disseminação da doença. A antibioticoterapia geralmente não é eficaz em virtude do padrão encapsulado da lesão. Os animais mais valiosos podem ser submetidos à drenagem cirúrgica com expectativa de êxito, mas devem ser mantidos isolados.

Nos casos de epizootias com processo pneumônico ou septicêmico convém descartar toda a colônia.

Por tratar-se de uma zoonose, as pessoas que manipulam os animais devem fazê-lo utilizando equipamentos de proteção individual.

Pneumonias Bacterianas

Os agentes que mais comumente causam pneumonias bacterianas em cobaias são *Bordetella bronchiseptica* e *Diplococcus pneumoniae (Streptococcus pneumoniae* ou *Pneumococcus)*.

No caso de *Bordetella*, é necessário um contato íntimo para que a doença se propague. As epizootias ocorrem geralmente depois de algum tipo de estresse, com 70% de morbidade e 30% a 40% de mortalidade. Ambos os sexos e todas as idades são susceptíveis, porém os mais jovens são mais afetados.

Na infecção por *Bordetella*, a necropsia revela pneumonia de severidade variável, de multifocal a difusa, com zonas de condensação roxo-acinzentadas. Pode estar presente traqueíte com exudato sanguinolento, pericardite e pleurite com fluido seroso claro amarelado. Foram relatadas metrite e vaginite. Microscopicamente, encontra-se uma broncopneumonia circundante. Mais tardiamente pode-se encontrar um exudato fibrinoso e acúmulo de células mononucleares e fibroblastos.

Diplococcus é um hóspede natural dos animais e a doença é induzida por estresse. Freqüentemente ela se caracteriza por uma condição crônica.

Na infecção por *Diplococcus*, os resultados da necropsia podem revelar pleurite fibrinopurulenta, pericardite, consolidação do pulmão, otite média, endometrite e meningite supurativa. Microscopicamente, há um edema marcante dos alvéolos, os quais estão repletos de exudato fibrinoso. Os pneumococos são facilmente demonstráveis em esfregaços diretos das lesões.

Os animais doentes deixam de se alimentar, mostram-se prostrados e podem apresentar dispnéia e descarga nasal. Além da forma pneumônica, suspeita-se que a enfermidade possa estar associada a infecções uterinas e conseqüentes problemas reprodutivos, podendo causar aborto em fêmeas prenhes.

Como em outras enfermidades bacterianas, o diagnóstico positivo depende do isolamento e da identificação do germe, a partir de amostras obtidas das narinas, da traquéia e dos pulmões.

Boas práticas de cuidado e manejo que reduzam o estresse favorecem o controle da doença.

Salmonelose

As enfermidades causadas por bactérias do gênero *Salmonella* são as mais freqüentemente relatadas em cobaias. Em razão de sua letalidade e risco de transmissão ao homem e outros animais, a salmonelose talvez seja a doença infecciosa mais importante nas cobaias.

Os sorotipos isolados com maior freqüência são *S. typhimurium* e *S. enteritidis.* Esses microorganismos podem se manter latentes nos animais da colônia, ou serem introduzidos por alimentos ou cama contaminados com excreta de roedores selvagens.

A infecção geralmente resulta da ingestão de alimentos ou água contaminada. Todas as idades, cepas e ambos os sexos são afetados. As fêmeas em estado de prenhez avançada e as crias jovens são mais susceptíveis. Os animais que se recuperam clinicamente da doença podem tornar-se portadores.

A doença pode se apresentar de forma latente, aguda, subaguda ou crônica. As infecções latentes se manifestam em estados de estresse (frio, calor, mudança de dieta, uso experimental). Inicialmente, ocorre aumento da mortalidade, diminuição de consumo de ração, o que acarreta severas perdas de crias e fêmeas prenhes e altas taxas de aborto. Em muitos animais, observa-se pelagem áspera, anorexia, perda de peso, debilidade geral e conjuntivite. A diarréia nem sempre está presente. A mortalidade pode variar de 50% a 100%. A patogenia geral da doença é: ingestão do agente, excreção transitória nas fezes, invasão dos linfonodos,

bacteremia, fagocitose no SMF, reinvasão da corrente sangüínea, infecção generalizada, invasão secundária dos intestinos, enterite e, se o animal sobreviver, eliminação contínua nas fezes.

Nos casos agudos geralmente não se observam lesões. Nos casos subagudos e crônicos, é comum a esplenomegalia visível. No fígado e baço são vistos pequenos pontos e nódulos brancos, assim como em outros órgãos da cavidade abdominal e torácica. A ruptura desses nódulos pode originar inflamações purulentas nas membranas serosas. Microscopicamente vê-se necrose com infiltração de histiócitos e neutrófilos. Também se formam lesões granulomatosas e abscessos.

O diagnóstico positivo depende do isolamento e da identificação do agente. Nos casos agudos, o cultivo de sangue pode ser suficiente, mas o baço é o órgão de eleição para o isolamento na necropsia. Devem ser usados meios de cultivo seletivos quando se quer recuperar o germe a partir de amostra fecal.

O controle da salmonelose é difícil em colônias convencionais. As vacinas autógenas protegem apenas contra um sorotipo. Os antibióticos controlam, mas não erradicam o agente. A prevenção é prejudicada pela extensa disseminação entre muitos animais. Em colônias com infecção estabelecida, a única solução conveniente é a eliminação de todos os animais, sanitização do ambiente e equipamentos e repovoamento com animais isentos de salmonelose. O uso de alimentos pasteurizados e de cama autoclavada, o controle freqüente das fezes, a destruição de gaiolas contaminadas e a remoção de animais doentes ajudam a retardar a reinfecção.

Yersiniose

Yersinia pseudotuberculosis é um agente patógeno comum dos roedores e causa síndromes específicas nas cobaias.

A enfermidade tem sido relatada mais comumente na Europa do que em outras partes do mundo. Quase todos os animais submetidos à prova se mostram susceptíveis à doença, e a forma septicêmica pode ser fatal no homem.

A infecção ocorre por meio da ingestão de alimentos contaminados, especialmente forragens precariamente sanitizadas.

Na cobaia se conhecem três formas clínicas. A mais comum é a pseudotuberculose clássica, com lesões caseosas nos gânglios mesentéricos e colônicos, linfadenites, emaciação, diarréia e conseqüente morte em 3 a 4 semanas. Os recém-nascidos podem estar infectados antes ou logo após o nascimento. Uma segunda forma reconhecida é uma pneumonia septicêmica aguda, na qual são observados acessos de tosse, taquipnéia e morte em 24 horas. Uma terceira manifestação é uma infecção crônica dos gânglios cervicais de curso fatal.

No exame *post mortem* de casos típicos, observam-se nódulos caseosos disseminados nas vísceras e nos gânglios linfáticos. Nos pulmões, as lesões, semelhantes a tubérculos, são geralmente subpleurais. Às vezes, o útero e as glândulas mamárias estão afetados. Na forma pneumônica, os pulmões estão severamente congestionados. Microscopicamente, há uma necrose coagulativa central com infiltração de neutrófilos e macrófagos circundantes. Os fibroblastos envolvem a lesão, e as células epitelióides podem ser numerosas. Não há formação de células gigantes nem calcificação. Dentro da massa necrótica podem ser vistos vasos sangüíneos obstruídos por êmbolos bacterianos.

O diagnóstico positivo depende do isolamento e identificação do agente. O cultivo é obtido facilmente do pus dos abscessos ou do sangue, em casos agudos.

As medidas de controle incluem boas práticas de manejo, especialmente a proteção dos alimentos contra pássaros e roedores silvestres. A palpação regular em busca de linfonodos mesentéricos aumentados pode detectar fases precoces, permitindo a remoção imediata do animal suspeito da colônia.

Doença de Tyzzer

É causada por *Bacillus piliformis*, um microorganismo intracelular obrigatório de classificação incerta.

Todas as espécies comuns de animais de laboratório são susceptíveis, assim como os animais domésticos e silvestres. A cobaia foi um dos últimos animais de laboratório cuja infecção natural foi relatada. As crias jovens e os animais submetidos a estresse são os mais afetados. A doença se caracteriza por diarréia, debilidade, pelagem áspera e morte.

Macroscopicamente, revelam-se emaciação e desidratação; a região perineal e membros posteriores mostram-se sujos de fezes diarréicas. O ceco está distendido e repleto de líquido. Os linfonodos mesentéricos e colônicos podem estar edemaciados.

As lesões microscópicas incluem edema na parede cecal e focos de necrose no cólon. O agente é revelado nas células epiteliais do íleo, ceco e cólon quando a amostra é corada pelos métodos de Warthin-Starry ou Gomori, aparecendo como aglomerações de bacilos filamentosos no citoplasma das células infectadas.

O agente não é cultivado em meios artificiais isentos de células, porém pode ser propagado em ovos embrionados de galinha.

As medidas de controle são incertas, visto que não se conhecem os meios de disseminação da doença e nem mesmo sua patogenia. Fica indicado o isolamento dos animais doentes, associado ao manejo correto.

Ainda não ficou estabelecido o significado dessa doença em saúde pública, porém foram encontrados macacos rhesus infectados e já foram detectados anticorpos em mulheres grávidas.

Pseudomonas aeruginosa

É um microorganismo amplamente distribuído e geralmente não-patogênico, acarretando maiores problemas caso as condições de criação sejam insalubres.

Em animais jovens pode determinar uma septicemia aguda, enquanto nos adultos podem aparecer abscessos subcutâneos crônicos. Também foi relatada severa broncopneumonia com focos necróticos.

Staphylococcus aureus

Este agente tem sido isolado de várias infecções na cobaia, incluindo dermatites, pododermatites, pneumonia e artrites.

S. aureus foi descrito como agente causador de uma pododermatite crônica com aumento das patas dianteiras de animais alojados em pisos precariamente higienizados.

Uma enfermidade esfoliativa da pele que afeta a maioria das fêmeas, caracterizada por eritema tóraco-abdominal ventral, com descamação, alopecia e cicatrização, em duas semanas, revelou semelhança estreita com uma afecção de pele em humanos causada por uma toxina extracelular de *S. aureus*.

Boas práticas de manejo e higiene não colaboram para o aparecimento desse tipo de infecção.

Klebisiella pneumoniae

Tem sido isolada com pouca freqüência como causa de enfermidade em cobaias, causando epizootias caracterizadas por septicemias bastante rápidas, com isolamento do agente a partir de todos os órgãos.

O agente é extensamente disseminado na natureza e o estresse pode precipitar os surtos.

Pasteurella multocida

É um habitante comum do trato respiratório superior de muitos animais. É duvidosa sua real importância como fonte de enfermidade para as cobaias, sendo necessário o isolamento do agente, essencialmente no diagnóstico diferencial da pseudotuberculose.

Corynebacterium pyogenes

São raros os relatos de isolamento de *C. pyogenes* e *C. kutcheri*, podendo não refletir a real incidência da enfermidade.

Leptospira spp

Apesar da leptospirose ter sido observada em cobaias silvestres na Argentina e no Brasil, raramente se tem informação da doença em cobaias de laboratório. O único caso relatado foi supostamente atribuído a uma estreita relação com ratos.

Mycobacterium spp

Os casos espontâneos de tuberculose são aparentemente raros em cobaias, apesar de esses animais serem altamente susceptíveis às infecções experimentais. As cobaias são eleitas para inoculação experimental de exudatos ou extratos de órgãos suspeitos. Supõe-se que os casos de infecções naturais tenham sido provenientes do contato com seres humanos infectados.

Doenças Infecciosas de Origem Viral e por Micoplasma

O significado de muitas infecções virais em cobaias ainda é indeterminado. Apesar de terem sido encontrados anticorpos contra alguns vírus, não foram descritos casos de enfermidades virais correspondentes. Serão aqui descritas apenas as infecções, de caráter natural, com possível significado para as colônias de produção.

Citomegalovírus (CMV) ou Vírus da Glândula Salivar de Cobaia

Trata-se de um herpesvírus que normalmente está presente nas glândulas salivares de cobaia, causando uma infecção latente. Pode acometer 80% dos adultos da colônia com inclusões nas glândulas salivares.

O citomegalovírus humano causa em torno de 1% de infecção congênita, determinando enterites, pneumonias e danos ao SNC no recém-nascido. A infecção na cobaia pode ser um bom modelo para estudo da infecção transplacentária no homem, visto que esta via é comum para ambas espécies, se a mãe se infectar primariamente durante a gestação.

Parece haver um maior índice de transmissão entre animais de sexos diferentes quando alojados juntos, sugerindo a transmissão sexual.

O CMV raramente aparece como uma doença generalizada, e determina duas fases de infecção na cobaia. A primeira fase aguda dura em torno de 10 dias, ocorrendo viremia e presença do vírus em vários tecidos, havendo mais tarde uma infecção crônica persistente com altos níveis de anticorpos. O vírus permanece nas glândulas salivares e pâncreas.

Observa-se hipertrofia das células epiteliais do ducto das glândulas salivares, com descentralização da cromatina nuclear e grandes corpos de inclusão intranucleares. As inclusões citoplasmáticas são raras e, quando presentes, estão acompanhadas de inclusões intranucleares. Durante fase aguda da infecção, as inclusões intranucleares podem ser vistas nos rins e fígado.

Herpesvírus-Like de Cobaia

É um vírus relativamente comum em muitas linhagens de cobaia; está aparentemente presente como uma infecção latente nesses animais. Embora tenha sido inicialmente correlacionado com o vírus da leucemia de cobaia e com o CMV, ainda não foi determinado papel específico para esse vírus em qualquer doença nessa espécie.

Vírus da Leucemia de Cobaias

Este vírus produz uma leucemia linfoblástica, determinando inicialmente sintomas inespecíficos, como pelagem áspera, prostração e inapetência. Ao mesmo tempo, observa-se enfartamento dos linfonodos periféricos e mesentéricos, paralisia posterior e ataxia terminal.

A necropsia revela manchas de cor cinza claro e aumento da maioria dos gânglios linfáticos e outros órgãos internos. Microscopicamente, pode haver infiltração linfoblástica em qualquer órgão. Os linfonodos, baço, medula óssea e placas de Peyer podem estar totalmente preenchidos por células leucêmicas. A contagem de leucócitos pode chegar de 25.000/ml a 250.000/ml. Não se conhece qualquer medida de controle.

Coriomeningite Linfocítica

Embora seja de ocorrência incomum na cobaia, essa enfermidade é de particular importância como em outras espécies, visto que é uma zoonose e a cobaia é susceptível. A infecção pode se dar por inalação, ingestão ou penetração através da pele intacta. Na cobaia, a doença é manifestada por sinais neurológicos de meningite e paralisia do trem posterior. Geralmente, não há lesões visíveis; microscopicamente há uma notável infiltração linfocitária nas leptomeninges da base do cérebro, nos plexos coróides do 3º e 4º ventrículos e em torno dos vasos sangüíneos submeníngeos. O camundongo selvagem é considerado o reservatório selvagem da doença, sendo o controle baseado em evitar o contato de animais de laboratório com roedores selvagens. Além de sua importância para a saúde pública, o vírus tem causado interferência nos trabalhos de transmissão de vários vírus.

Micoplasma spp

Não se tem associado doenças graves ou mortais em cobaias determinadas por micoplasmas. Já foram identificados vários pontos de infecção, inclusive abscessos cervicais. Foi reconhecida uma espécie nesse hospedeiro, conhecida como *Micoplasma caviae*, embora outros tenham sido isolados mas não identificados.

Doenças Parasitárias

Ectoparasitas

Piolhos

Gyropus ovalis e *Gliricola porcelli*

Ácaros

Chirodiscoides caviae

São considerados de baixa importância clínica, sendo geralmente encontrados em colônias convencionais de cobaia, nas criações comerciais e entre os animais silvestres. Mesmo assim as infestações são brandas, o que torna rara qualquer sintomatologia. Nos casos extremos, podem ocorrer escoriações por causa do prurido intenso; também pode haver alopecia.

O diagnóstico se baseia na identificação do parasita.

O controle é obtido mediante a aplicação direta de inseticidas no pêlo do animal (visto que o piolho não abandona o hospedeiro); utiliza-se talcos à base de piretrina a 0,2% ou curtas exposições, ao vapor, de dichlorvos. O tratamento é repetido semanalmente durante 3 semanas (ciclo vital completo dura de 2 a 3 semanas); ao mesmo tempo, todos os equipamentos devem ser higienizados. A quarentena de animais recém-introduzidos e o tratamento desses animais, se necessário, também compõe medidas de controle.

Endoparasitos

Protozoários entéricos

Eimeria caviae

Este protozoário é responsável pela endoparasitose mais significativa da cobaia e sua presença já foi relatada em todo o mundo.

Apesar de geralmente não ser patogênica, nas infestações mais extremas podem ocorrer tiflite e colite, manifestadas por diarréia, anorexia, letargia, o que pode acarretar até 40% de mortalidade.

O diagnóstico é confirmado pela identificação dos oocistos nas fezes ou, no exame *post mortem*, pelos achados de necropsia que incluem hiperemia da parede do cólon, petéquias e nódulos brancos (que contêm oocistos) na mucosa.

Essa condição pode ser controlada com a adoção de práticas sanitárias corretas, adequação de técnicas de criação e uso de coccidiostáticos. Foi relatado que o uso de uma solução de sulfametazina ou sulfametiltiazol a 0,2%, na água de beber, teve êxito no controle dessa condição. Vale ressaltar que o tratamento de colônias de animais destinados à experimentação é restrito, não devendo interferir nas respostas das pesquisas. É aconselhável o tratamento apenas das matrizes e dos animais destinados à reposição das mesmas.

Cryptosporidium wrairi

É encontrado comumente na mucosa do íleo de cobaia. Não é considerado patogênico, mas já foi responsabilizado por perda de peso e enterites crônicas sem diarréia. O diagnóstico é efetuado pela visualização dos diferentes estágios de desenvolvimento na mucosa intestinal. As medidas de controle são semelhantes àquelas aplicadas para a eimeriose.

Balantidium caviae

É encontrado normalmente no ceco e, geralmente, não é considerado patogênico.

Pode tornar-se um invasor secundário se a mucosa já tiver sido lesionada por uma infecção concorrente como salmonelose. Causa morte em cobaias imunodeficientes. Pode ser controlado com boas práticas de higiene e manejo.

Protozoários tissulares

Leishmania enrietti

É espécie-específico para a cobaia, sendo utilizado em pesquisa sobre leishmaniose cutânea nessa espécie.

As lesões mais freqüentes são as úlceras cutâneas, principalmente nos dedos, orelhas e nariz. A medula óssea, gânglios linfáticos e órgãos genitais também são afetados em infecções experimentais.

O diagnóstico é feito pela identificação do parasita visualizado em cortes de amostras coradas por Giemsa.

Não há tratamento e o controle é feito impedindo-se a entrada de possíveis vetores na colônia.

Klossiella cobayae

Não é considerado patogênico, porém pode confundir investigações relacionadas à histopatologia renal.

É um parasita das células do epitélio renal e do endotélio glomerular. Não há sintomatologia clínica e as lesões macroscópicas são vistas apenas em infecções graves quando a superfície renal está irregular.

O diagnóstico é baseado na identificação microscópica das diferentes formas evolutivas do parasita no rim, devendo ser diferenciado de outros protozoários como *Toxoplasma* e *Encephalitozoon*.

O controle é baseado em boas práticas de manejo e higiene, que reduzem a possibilidade de contato com urina infectada.

Pneumocystis carinii

É um parasita de pulmão, específico dessa espécie, podendo causar pneumonia intersticial e morte em animais imunodeficientes. Na pneumonia, os pulmões estão consolidados com muitos alvéolos repletos de líquido protéico contendo o agente.

Toxoplasma gondii

Na cobaia, como na maioria dos mamíferos, ocorre o ciclo assexuado (hospedeiro intermediário). É uma zoonose. As infecções naturais são geralmente assintomáticas.

O parasita pode ser identificado em preparações de secções histológicas de tecidos infectados, principalmente coração e cérebro.

O tratamento, à base de um preparado de 60 ppm de sulfadiazina, é recomendado apenas para animais de grande valor. Deve-se evitar a contaminação da ração por fezes de gatos e prevenir o canibalismo na colônia.

Sarcocystis caviae

É relativamente não-patogênico e freqüentemente confundido com o toxoplasma quando encontrado no tecido muscular. A forma cística se desenvolve no músculo cardíaco e esquelético.

Não há sintomatologia e o diagnóstico depende da visualização do microorganismo em cortes histológicos de tecido muscular.

O controle é obtido pela higiene adequada, sobretudo em relação à água e à ração.

Encephalitozoon cuniculi

Este protozoário causa doença apenas em coelhos, mas pode ser raramente encontrado em tecidos de várias espécies, porém é raro na cobaia.

Deve ser ressaltado no diagnóstico diferencial da toxoplasmose por meio de técnicas de coloração: na hematoxilina-eosina, esse parasita é precariamente corado, ao contrário do toxoplasma, que é bem corado; o toxoplasma é gram-positivo, enquanto *Encephalitozoon* é gram-negativo.

Trematódeos

Fasciola hepatica e *Fasciola gigantica*

As infestações por estes parasitas não são freqüentes. No ciclo de vida, o caracol é hospedeiro intermediário e a metacercária é ingerida com a vegetação pelo mamífero, em cuja parede intestinal o parasita migra até chegar ao fígado, onde se aloja nos canais biliares.

Os sintomas são inespecíficos, porém associados aos danos no fígado: anorexia, icterícia, debilidade geral e morte.

O diagnóstico é baseado na identificação do parasita adulto no fígado durante o exame *post mortem* ou pela identificação dos ovos nas fezes.

O controle é eficaz mediante tratamento com uma única dose de hexacloroetano, por via oral, na dosagem de 0,3 g/kg de peso vivo. Se os animais forem alimentados com vegetais frescos, estes devem ser previamente lavados antes de ingeridos.

Nematódeos

Paraspidodera uncinata

Este parasita de ceco e cólon é o único helminto que se encontra facilmente na cobaia. O ciclo de vida é fecal-oral direto. Geralmente ele não é patogênico, mas pode acarretar a perda de peso e diarréias nas infecções graves.

O diagnóstico é confirmado pela identificação das formas adultas no ceco e cólon durante o exame *post mortem* ou pela identificação dos ovos em amostras fecais.

O tratamento com levamisol na dosagem de 25 mg/kg, por via subcutânea, é seguro e eficiente. Medidas adequadas de higiene e manejo favorecem o controle da infecção.

Doenças Não-Infecciosas

Toxemia Gravídica

Esta síndrome ocorre com certa freqüência na cobaia durante a gestação avançada, sendo caracterizada por acidose, cetose, degeneração gordurosa hepática, culminando com a morte.

É considerada uma desordem metabólica e, dessa forma, um conjunto de fatores parece determinar a causa da doença: obesidade, jejum, carga fetal e outros. Foi sugerido que a compressão da aorta pela massa fetal, prejudicando a circulação, pode favorecer a toxemia gravídica. Um componente genético também já foi cogitado para tal condição.

Os animais especialmente susceptíveis são cobaias obesas, gestando três ou mais fetos, a partir do 56º dia de gestação. Entretanto, a prenhez não é uma condição essencial, visto que cobaias virgens e obesas podem vir a óbito da mesma forma se forem submetidas a estresse. Evidências experimentais indicam que a obesidade, somada ao estresse, principalmente em razão de jejum prolongado durante a fase final da gestação, pode induzir à síndrome.

Os sintomas iniciam em torno de 7 a 10 dias antes do parto, são de curso agudo caracterizados por hiporexia, perda de peso, pelagem áspera, prostração, dispnéia e morte. O pH normal da urina de 9 vai a um pH ácido de 5 a 6. Ocorre também proteinúria e cetonúria.

No exame *post mortem* são observadas isquemia uteroplacentária, com hemorragia e necrose nos sítios de união placentária; fígado de cor amarelo-castanho com zonas necróticas; supra-renais aumentadas com hemorragias na cápsula e córtex, e hemorragia subcapsulares nos rins.

Microscopicamente, revelam-se hemorragias, necrose e edema nas zonas de inserção da placenta, pronunciada infiltração adiposa no fígado, com necrose de coagulação periportal e degeneração. Notam-se hemorragias difusas nas supra-renais, necrose das células tubulares proximais do rim, com hemorragia e trombose na cápsula.

Para efeito de controle, é indicada qualquer medida para se estabelecer um bom manejo. Fica sugerida a limitação da ingestão de alimento a fim de se evitar a obesidade, acasalar fêmeas primíparas antes que pesem 500 g, controlando o peso das demais para que não sejam mantidas em produção com mais de 900 g.

O emprego de sistemas de criação que demandem altas taxas de produção é recomendado. Evitar o estresse, mudanças bruscas na dieta e outros fatores que determinem abstinência desfavorecem a condição.

Escorbuto

Escorbuto é a doença caracterizada pela deficiência de vitamina C (ácido ascórbico), que acomete algumas espécies animais incapazes de sintetizar, por meios próprios, tal composto. Entre os mamíferos, estão incluídos o homem, os primatas não-humanos, a cobaia e o morcego frutífero.

A incapacidade de sintetizar a vitamina C é de origem genética. As espécies susceptíveis a desenvolver a doença não possuem o gene que codifica a síntese da enzima hepática gulonolactona-oxidase, envolvida na síntese da vitamina C a partir da glicose. Portanto, nessas espécies, se a dieta não for suplementada com alguma fonte exógena de vitamina C, o escorbuto se estabelecerá num prazo variável para cada espécie.

É decorrente da ausência da vitamina C em suas funções normais dentro do organismo. O efeito maior está relacionado com a síntese do colágeno, na qual o ácido ascórbico é essencial. A deficiência de colágeno provoca vários sintomas de severidade variável conforme o grau de deficiência, tais como: perda de peso, hiporexia, diarréia, secreção nasal e ocular, tumefação das articulações costocondrais e gengivite; o desempenho reprodutivo também pode estar prejudicado; a cicatrização de feridas e a coagulação do sangue estarão comprometidas.

São visíveis as anormalidades relacionadas aos ossos e vasos sangüíneos. Comumente são observadas hemorragias subperiósticas nos tecidos subcutâneos, nos músculos esqueléticos e intestinos. Outras lesões secundárias podem estar presentes, visto que essa doença aumenta a susceptibilidade a outras enfermidades.

Microscopicamente, o escorbuto determina hemorragias em diversos tecidos como periósteo, subcutâneo e epitélios. Ocorrem alterações típicas nas zonas de ossificação dos ossos longos, havendo diminuição da espessura das zonas de proliferação e maturação da cartilagem, com perda da disposição das trabéculas cartilaginosas. A falha no desenvolvimento ósseo favorece as fraturas, hemorragias e tumefações, em decorrência de prejuízo na proliferação de fibroblastos.

Previne-se o escorbuto através da administração de vitamina C na água de beber ou na ração. Devido ao rápido consumo e ao limitado armazenamento no organismo, a vitamina C deve ser oferecida diariamente ou no mínimo a cada 3 dias, superando a perda diária do elemento. O requerimento exato varia com a condição fisiológica. Sugere-se 10 mg/kg de peso vivo ao dia para manutenção e 30 mg/kg de peso vivo ao dia para fêmeas prenhes. Na água de beber pode ser adicionado no mínimo 200 mg/l, sendo a mesma trocada diariamente, pois o ácido ascórbico é degradado em torno de 50% a cada 24 horas.

Alopécia

Na fase final da gestação e no pós-parto, sobretudo nas linhagens albinas de cobaia, é comum a ocorrência de perda de pêlo de maneira uniforme. O crescimento do pêlo volta ao normal imediatamente após o parto e a pelagem se normaliza em 3 a 4 semanas.

A probabilidade de recidiva do quadro aumenta a cada gestação, havendo casos em que o animal se torna totalmente desprovido de pêlos.

A ocorrência desse tipo de alopécia não é exclusiva de fêmeas em gestação, podendo ocorrer também entre os animais submetidos ao estresse da experimentação. Os machos são raramente afetados.

A etiologia da alopécia ainda não foi compreendida, embora não se questione que está relacionada ao estresse. Uma causa hereditária já foi cogitada. Entretanto, a seleção dos descendentes não mostrou êxito na tentativa de eliminar a condição.

Calcificação de Tecidos Moles

Trata-se de uma condição freqüentemente encontrada nos exames *post mortem* de animais com mais de um ano de idade. Caracteriza-se pela deposição de cálcio em órgãos como fígado, coração, pulmões e rins.

A doença pode ser causada por um desequilíbrio dietético entre cálcio, fosfato, magnésio e potássio. Também já foi sugerido que o excesso de ingestão de vitamina D pode contribuir para o aparecimento da lesão.

O controle cuidadoso de tais elementos na dieta é imperativo na manutenção do equilíbrio ácido-base e na prevenção da calcificação dos tecidos moles.

"Babeira"

É uma afecção descrita na cobaia, caracterizada por presença de contínua umidade ao redor da boca, região mentoniana e região ventral do pescoço. O quadro pode evoluir para inapetência, perda de peso e morte.

A etiologia desse quadro está envolvida com dieta inadequada e dentição defeituosa. As oclusões anormais da boca podem produzir um excessivo crescimento dos dentes, o que determina dificuldade para mastigar, beber e reter saliva. A predisposição genética, excessos ou deficiência de alguns nutrientes e substâncias tóxicas na dieta podem favorecer a má oclusão.

Bibliografia

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to Use and Care of Experimental Animals*. Otawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

Organización Panamericana de La Salud (OPS). *Temas Seleccionados sobre Medicina de Animales de Laboratório: el cobayo.* Rio de Janeiro: CPFA/OPS/OMS, 1976. (Serie de Monografias Cientificas y Tecnicas)

12

Criação e Manejo de Coelhos

Sebastião Enes Reis Couto

Origem

O coelho é proveniente da Península Ibérica e do norte da África. O coelho caseiro tem sua origem a partir da domesticação e criação de coelhos silvestres na Idade Média, principalmente em mosteiros franceses. Constitui uma das mais importantes fontes de proteína animal para alimentação humana nos EUA e no continente europeu.

Várias características levaram os coelhos a serem considerados animais convencionais de laboratório. Apesar de serem descendentes de coelhos naturalmente agressivos, os que atualmente são mantidos em biotérios diferem muito daqueles utilizados séculos atrás, pois, em virtude da seleção genética e da convivência com o homem, tornaram-se animais dóceis e de fácil manejo. As modificações induzidas nesses animais estão baseadas em um complexo trabalho de acasalamentos direcionados, que visa a manter nos filhotes algumas características dos pais, eliminando comportamento ou alterações indesejáveis.

Importância na Experimentação Biológica

O coelho foi um dos primeiros animais utilizados na investigação biomédica. Pasteur, em 1884, demonstrou que os cães podiam ser protegidos contra o vírus da raiva, mediante a inoculação de suspensões da medula espinhal, dessecada, de coelhos infectados experimentalmente com o vírus dessa enfermidade.

Em razão de sua hipersensibilidade, os coelhos são muito utilizados na prova de irritantes cutâneos primários, rubefacientes, fotossensibilizadores, irritantes dos olhos e outros alérgicos. É a espécie de eleição para testar a capacidade pirógena de preparados farmacológicos e biológicos.

As grandes veias marginais de sua orelha proporcionam um acesso fácil ao sistema circulatório, constituindo-se um recurso valioso na investigação sorológica e imunológica.

Em resumo, o coelho é utilizado em quase todas as áreas da investigação biomédica, contribuindo grandemente para inúmeros estudos científicos.

Posição Taxonômica

Quadro 1 – Ordem Lagomorpha

FAMILIA LEPORIDAE (COELHOS E LEBRES)		FAMILIA OCHOTONIDAE ("PIKAS Y CONEY")
Gêneros de Coelhos	Gêneros de Lebres	Gêneros
1. *Oryctolagus* (coelho doméstico) *O. cuniculus*	1. *Lepus* (lebre) 26 espécies	1. *Ochotona* 14 espécies
2. *Sylvilagus* (coelho comum) 13 espécies	2. *Poelagus* 15 espécies	
3. *Pentalagus* 1 espécie	3. *Nesolagus* 1 espécie	
4. *Romeralagus* 1 espécie		
5. *Pronolagus* 4 espécies		
6. *Caprolagus* 1 espécie		

Fonte: *Temas Seleccionados sobre Medicina de Animales de Laboratório: el conejo* (1976).

Figura 1 – *Oryctolagus cuniculus*

Fonte: Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz.

O coelho de laboratório (*Oryctolagus cuniculus*) esteve, durante muito tempo, incluído na ordem Rodentia. Na atualidade, pertence à ordem Lagomorpha, por causa da diferença anatômica de sua dentição. A presença de quatro incisivos na mandíbula superior permite distinguir os lagomorfos dos roedores.

Pelo fato desses animais serem explorados, sobretudo para produção de carne, os sistemas de criação e produção são amplamente estudados e difundidos em tratados específicos. O coelho de laboratório é um dos poucos animais que mantém o conceito de raça como unidade de manejo.

Dentre as raças mais utilizadas para fins laboratoriais, destacamos as seguintes:

Nova zelândia – peso entre 4 kg a 6 kg, de reconhecida docilidade, fácil reprodução e manejo, e com uniformidade de reações nas provas experimentais;

Gigantes de flandes – atinge mais de 6 kg, preferido para a obtenção de soro imunológico;

Califórnia – peso de 3 kg a 5 kg, apresenta diversas zonas pigmentadas em negro sobre o fundo branco. Sua principal característica é a rusticidade;

Holandês – com menos de 2,5 kg, é bastante utilizado como animal de experimentação em virtude de seu pequeno porte e resistência às contaminações ambientais.

Comportamento

Os coelhos, de uma maneira geral, são dóceis, podendo morder ou arranhar em razão da contenção incorreta. São susceptíveis ao estresse, assustando-se facilmente. Não se deve manter machos adultos em uma mesma gaiola para evitar brigas (disputa de território). As fêmeas adultas também não devem ser mantidas na mesma gaiola por apresentarem pseudogestação.

Esses animais são mais sensíveis ao calor que ao frio. A temperatura recomendável varia de 17 ºC a 21 ºC e a umidade relativa de 40% a 60%.

Principais Características Anatômicas e Fisiológicas

Os coelhos têm corpo arredondado, cabeça grande provida de largas orelhas, com audição e olfato bem desenvolvidos e amplo campo de visão. A fórmula dentária dos coelhos adultos é: incisivo 2/1, caninos 0/0, pré-molar 3/2, molar 3/3. Todos os dentes têm crescimento contínuo. O crescimento do incisivo é particularmente rápido, de aproximadamente 0,5 cm por ano, motivo pelo qual o animal deve ter contato com materiais que possa roer. Apesar disso, não é rara a observação de animais com crescimento excessivo dos incisivos, o que provoca má oclusão dentária. Esta é determinada por hereditariedade e impede a continuidade do animal no plantel, pois poderá passar tal característica indesejável aos seus descendentes. As patas posteriores são mais compridas que as anteriores, o coração se encontra situado na parte média da caixa torácica, ligeiramente desviado para a esquerda, e não tem a aorta anterior.

A temperatura média do corpo é 38,3 ºC, podendo chegar a 39 ºC quando submetido ao estresse. A urina do coelho é normalmente muito alcalina, com alto teor de cristais de fosfato e carbonatos. Sua cor oscila de amarelo intenso ou turvo-pardo, que pode ser confundida com uma descarga purulenta.

O sistema genital é similar ao dos mamíferos típicos. A fêmea tem dois cornos uterinos e ambos se comunicam, separadamente, com a vagina. A fêmea possui de 3 a 5 pares de tetas. O macho não tem glande e nem vesículas seminais. A fêmea é poliéstrica, podendo ser coberta a qualquer época do ano. Como a gata e a fêmea do furão, a coelha está incluída entre os animais de ovulação provocada, ovula somente após a cópula e/ou uma forte excitação sexual, muito embora exista uma pequena porcentagem que pode ovular espontaneamente.

Os coelhos são sensíveis à penicilina. Esta pode causar distúrbio de sua flora intestinal e produzir diarréia. A ampicilina é particularmente tóxica para o coelho.

Nutrição

O coelho é fundamentalmente herbívoro e come a maioria dos tipos de grãos, verduras e pastos.

Tem um ceco grande, o qual produz uma fermentação bacteriana considerável. Pratica a coprofagia noturna, coletando fezes diretamente do ânus. Essas fezes são envolvidas por uma membrana mucosa. Se supõe que a coprofagia, juntamente com a fermentação fecal, proporcionam as quantidades necessárias das vitaminas do grupo B, protegendo contra alguma deficiência de aminoácidos essenciais, e facilitam a digestão adicional de fibra e outros nutrientes, por uma segunda passagem através do trato digestivo. A síntese da vitamina ocorre no ceco. As rações comerciais são peletizadas, com diâmetro no máximo de 50 mm por 70 mm de comprimento, contendo todos os nutrientes necessários, como: proteínas, carboidrato, fibras, vitaminas e outros. Os coelhos da raça Nova Zelândia adultos consomem em média 100 g a 200 g de ração por dia. As fêmeas com lactentes precisam quantidade maior de ração, aumentada gradualmente com o crescimento dos filhotes.

Tabela 1 – Necessidades nutricionais para coelhos (concentração na dieta)

NUTRIENTE	UNIDADE	NECESSIDADE
Proteínas (Cresc.)	%	16,0
Proteína (Reprod.)	%	18,0
Lipídios	%	2,0
Fibra bruta	%	12,
Energia total	kcal	2.500
AMINOÁCIDOS		
Arginina	%	0,6
Histidina	%	0,3
Isoleucina	%	1,6
Leucina	%	1,1
Lisina	%	0,65
Metionina	%	0,6
Fenilalanina	%	1,1
Treonina	%	0,6
Triptofano	%	0,2
Valina	%	0,7
MINERAIS		
Cálcio	%	0,4
Magnésio	ppm	350
Fósforo	%	0,22
Potássio	%	0,60
Sódio	%	0,20
Cobre	ppm	3,0
Iodo	ppm	0,2
Manganês	ppm	8,5
VITAMINAS	Unidade	Necessidades
A	UI/kg	580,
D	UI//kg	150,
E	UI/kg	40,
Biotina	mg/kg	0,2
Colina	mg/kg	1.200

Tabela 1 – Necessidades nutricionais para coelhos (concentração na dieta)(continuação)

VITAMINAS	UNIDADE	NECESSIDADE
Colina	mg/kg	1.200
Ácido Fólico	mg/kg	0,5
Niacina	mg/kg	180,
Riboflavina	mg/kg	7,0
Tiamina	mg/kg	5,0
Piridoxina	mg/kg	39,0
Cianocobalamina	ug/kg	10,0

Fonte: *Nutrient Requirements of Laboratory Animals* (1978).

A quantidade de ração recomendada deve ser administrada uma vez por dia, evitando assim o aumento do consumo de alimento, o que propiciaria a engorda excessiva dos animais, prejudicando, principalmente, a capacidade reprodutiva.

A água deverá ser providenciada diariamente e *ad libitum*. O consumo de água normal de coelho de dois meses de idade é de 120 ml/kg/dia, e de um coelho de 1 ano de idade é de 64 ml/kg/dia. Os bebedouros (com capacidade de 1.000 ml) devem ser trocados, higienizados e esterilizados diariamente.

Manejo dos Reprodutores

Uma criação deve ser iniciada com animais comprovadamente puros, de *pedigree* e criteriosamente selecionados pelos valores genéticos e estéticos.

Os animais escolhidos para futuros reprodutores deverão ser alojados em gaiolas individuais, com dimensões mínimas de 45 x 60 x 40 cm, a partir dos 2 meses de idade. A puberdade ocorre entre 150 – 180 dias, com peso entre 3.000 g a 3.500 g. A relação entre macho e fêmea, para acasalamento, é de 1 macho para cada 10-12 fêmeas reprodutoras. Porém, em se tratando de uma colônia fechada, a relação de macho e fêmea passa a ser de 3 a 4 machos para 10 a 12 fêmeas na tentativa de evitar o aumento da consangüinidade da colônia (ver o tópico Controle da Consangüinidade na Colônia).

Para acasalamento, os machos e as fêmeas deverão ter, no mínimo, 6 meses de idade. Durante os 3 primeiros meses, o macho não deverá fazer mais de duas coberturas por semana.

Considerando-se um biotério de criação, os coelhos com cerca de três a quatro anos de idade são descartados, devido ao declínio de sua capacidade reprodutiva.

Reprodução e Acasalamento

A coelha deve ser levada à gaiola do macho para facilitar o acasalamento, pois, caso contrário, o macho, fora do seu território, passará a examinar o novo local, deixando de fazer a cobertura.

Uma vez introduzida a fêmea na gaiola do macho, deverá ocorrer a cobertura após alguns minutos. É conveniente que o técnico assista e constate a cobertura, observando o comportamento do macho (que se deixa cair de costas emitindo ruídos guturais, ainda preso à fêmea) e/ou, por meio de um simples exame da vagina, observa-se a presença de líquido seminal.

Se a coelha tenta fugir do macho, correndo em círculos, basta o técnico colocar sua mão diante da cabeça da fêmea para detê-la. Se o problema persistir, será melhor levar a outro macho. Após o acasalamento, a fêmea será levada a sua gaiola. Em nenhuma hipótese ela deverá ser deixada com o macho.

A retirada da coelha da gaiola deve ser feita com bastante calma e cuidado, impedindo que o animal dê patadas com os membros posteriores. Para se evitar esse problema, recomenda-se devolvê-la a sua gaiola com a introdução da parte posterior do animal em primeiro lugar.

Ao contrário da maioria dos mamíferos, a coelha não tem ciclo estral regular. Ela poderá ser fecundada durante 12 dos 16 dias de duração de seu ciclo ovariano.

A ovulação ocorre, aproximadamente, 10 horas após a cópula.

O acasalamento (cópula), de modo geral, é feito no 30º dia após o parto. Porém, em se tratando de animais de laboratório, está relacionado com o peso da fêmea e da ninhada. Geralmente ocorre 40 dias após o parto no momento do desmame.

A fêmea que apresentar abertura da vulva com uma cor vermelha escura poderá proporcionar de 70% a 75% de fertilização. Se a vulva é de cor vermelha pálida, a fêmea estará na última etapa do estro e a fertilização ocorrerá em 30%. Apesar de tal método de observação exigir maior tempo, é o que proporciona melhores resultados. Também podemos verificar o comportamento da fêmea diante do macho sugerindo ou não receptividade à cobertura, tais como: inquieta, levantando o trem posterior, cabeça baixa entre as patas dianteiras, esfregando-se nas paredes da gaiola, agitando a cauda com movimento nervoso etc. A fim de assegurar a fecundação, recomendamos duas a três cópulas, sempre assistidas pelo técnico.

Período de Gestação e Diagnóstico

A gestação tem duração de 30 a 32 dias. Com o propósito de evitar a manutenção de fêmeas 'ociosas', o técnico deve constatar a gravidez, depois da cobertura, palpando delicadamente a parte posterior do ventre da coelha (palpação abdominal), no 14º dia após o acasalamento, para sentir os fetos. Caso não os encontre, deverá ser coberta novamente.

A palpação é feita colocando-se a mão sobre o ventre da coelha, pressionando-se suavemente de trás para a frente e com o dedo polegar de um lado e o indicador e o médio do outro.

Pseudogestação

Ocorre em virtude da presença do macho ou quando montada por outra fêmea. Esses estímulos determinam a ovulação e o corpo lúteo, que persiste de 18-21 dias, quando então ocorre secreção de progesterona, a qual promove o aumento das mamas e o início da retirada dos pêlos do abdômen para fazer o ninho.

Parto e Manejo dos Láparos

No período compreendido entre 2 a 3 dias antes do parto, o técnico deverá colocar na gaiola da fêmea (com dimensões mínimas de 90 x 60 x 40 cm) o material necessário para fazer o ninho (feno ou palha). A própria fêmea se encarregará de preparar o ninho, completando-o com os pêlos retirados do abdômen, que também facilitará o aleitamento e favorecerá a transferência de calor para os filhotes. Geralmente o parto ocorre à noite e não requer nenhuma assistência por parte do técnico.

O ninho deve ser manuseado com extrema delicadeza, caso contrário a fêmea poderá vir a rejeitar seus filhotes. Os láparos nascem com 60 g a 80 g, com ausência de pêlos, com olhos e orelhas fechados e com dentes incisivos. Os olhos são abertos no 10º dia e os filhotes iniciam sua alimentação sólida 15 dias após o nascimento.

A média da ninhada é de 6-8 láparos, excepcionalmente podendo chegar a 15. Quando ocorre parto com mais de 10 láparos, os excedentes deverão ser transferidos para outra coelha que tenha menos de 8, e com 2 a 3 dias (no máximo) de diferença de idade.

O técnico deve verificar os ninhos, diariamente, retirando os láparos mortos, bem como os que estão muito fracos. Antes de colocar as mãos nos filhotes, o técnico deve esfregá-las no material do ninho para evitar rejeição da ninhada pela fêmea ou o canibalismo. As principais causas da rejeição e do canibalismo estão relacionadas ao manejo inadequado, presença de láparos mortos ou deformados, fêmeas do 1º parto, mamites, ninhos defeituosos e estresse. A coelha que abortar ou praticar o canibalismo em partos sucessivos deve ser descartada da colônia.

Procedimento no Desmame

Os filhotes serão desmamados por volta dos 40 dias de idade, com peso entre 800-1.500 g. Deve-se retirar a mãe da gaiola e manter a ninhada por uma semana, evitando, assim, mudança brusca do seu hábitat e quebra do equilíbrio, que, conseqüentemente, causam problemas digestivos e diarréia. Na segunda semana, após o desmame, separa-se machos e fêmeas, agrupando-os com outras ninhadas que tenham o mesmo tamanho.

Sexagem

A distância ano-genital nos machos recém-nascidos é visivelmente maior do que nas fêmeas. A determinação do sexo se faz contendo-se adequadamente o animal, trazendo-o contra seu corpo, separando-se as patas posteriores com uma das mãos e com o polegar vai-se empurrando ligeiramente para dentro os órgãos genitais externos. Os machos apresentam o pênis com extremidade arredondada e as fêmeas apresentam abertura vaginal e a vulva. Em algumas raças as características sexuais secundárias são aparentes. As fêmeas podem apresentar papadas e os machos são mais gordos e têm a cabeça quadrada.

Controle da Consangüinidade na Colônia

Animais consangüíneos – *Inbred* – são obtidos pelo acasalamento entre irmãos e/ou pais e filhos durante 20 ou mais gerações consecutivas. É difícil de se obter homozigose total em razão do elevado número de genes letais presentes na constituição genética dos coelhos. Uma lista de 19 variedades figuram em um trabalho publicado por Jay (apud OPS, 1976).

Animais não-consangüíneos – *Outbred* – são os que apresentam constituição genética variada, em estado de heterozigose, que deve ser conhecida e mantida. O emprego do sistema de acasalamento rotacional visa a manter animais heterozigotos, evitando-se o acasalamento de parentes próximos e assegurando-se que a geração seguinte venha de um maior número de pais do que o que ocorreria se fosse feito ao acaso. Ao empregar esse sistema, a colônia se desenvolve em vários grupos de igual número de modo que a quantidade de fêmeas e machos em todos os grupos é sempre igual. O número de grupo de uma colônia está relacionado ao seu tamanho (número de reprodutores). Quanto menor a colônia, maior o número de grupos.

Em uma colônia de criação e produção de coelhos, utilizamos um sistema de acasalamento similar ao sistema rotacional (Método Poiley).

Suponhamos que a colônia consista de 120 fêmeas e 36 machos, com gaiolas individuais para cada reprodutor, numeradas de forma que identifique os grupos, e que essa colônia esteja dividida em 6 grupos, onde cada um deles é constituído de 20 fêmeas e 6 machos.

Quadro 2 – Esquema de acasalamento para cada geração de coelhos

Formação do novo grupo	=	Macho do grupo	x	Fêmea do grupo
1	=	3		6
2	=	6		1
3	=	5		2
4	=	1		3
5	=	2		4
6	=	4		5

A duração de ciclo de acasalamento (período reprodutivo) é determinado pela biologia reprodutiva da espécie, que nos coelhos varia de 3 a 4 anos.

A próxima geração será formada por fêmeas filhas de cada reprodutora e machos filhos de cada reprodutor da colônia.

Produção Mensal Estimada em uma Colônia com 120 Fêmeas e 36 Machos Reprodutores

Sabendo-se:

Período médio de gestação = 30 dias
Número médio de filhotes/parto = 6,67
Taxa de mortalidade de lactente = 10%
Número de filhote/desmamados/partos = 6,0
Desmame = 42 dias de idade
Acasalamento = 30º dia após o parto e/ou no final do segundo ciclo ovariano
Intervalo entre partos = 30 dias de gestação
30 dias após o parto
30 dias de gestação
90 dias

365 dias (ano): 90 dias (intervalo) = 4 partos/ano
4 partos x 6 láparos = 24 láparos desmamados/ano/fêmea
24 láparos (ano) x 120 fêmeas = 2.880 láparos desmamados/ano, ou seja, 240 láparos desmamados/mês.

Dos láparos nascidos e/ou desmamados, 50% são fêmeas e 50% são machos.

A cada período de 36 meses, o número de reprodutores (macho e fêmea) é substituído em 100%. Mensalmente, são substituídos 1:36 das fêmeas = 3,3 e 1:36 dos machos =1.

Considerando que a taxa de mortalidade dos reprodutores e animais em crescimento seja 2,5%, necessitamos de uma reserva mensal de 4 fêmeas e 2 machos para futuros reprodutores.

Identificação dos Animais e Registro da Colônia

Para um efetivo controle e conhecimento da colônia, é necessário que se faça a identificação individual dos animais e um adequado registro de todas as ocorrências, que constituem parte fundamental do trabalho diário do bioterista. No que se refere à identificação dos animais, não existem normas rígidas a serem seguidas. O técnico deverá utilizar materiais disponíveis em seu biotério, porém existem métodos que, pelo uso corrente, demonstram eficiência e servem como orientação ao técnico, como:

Para Identificação dos Animais

Aplicação de corantes – soluções concentradas de ácido pícrico (amarelo), de fucsina (roxo), de violeta de metila ou genciana (violeta) etc. Lembramos que esse tipo de identificação, embora eficiente, é de curta duração e deve ser periodicamente renovada.

Tatuagens – os aparelhos disponíveis para essa finalidade, os tatuadores, são facilmente encontrados no mercado. Eles marcam diretamente números ou letras com a utilização de tinta preta para animais albinos, ou verde para animais com pelagem colorida. As tatuagens são feitas nas regiões menos vascularizadas, na superfície interna do pavilhão auricular e é indispensável a assepsia e anestesia local. Trata-se de um processo de rápida visualização e dura por toda a vida do animal.

Fichas de identificação e livros de registros – talvez o trabalho de maior responsabilidade a ser executado no biotério seja o de anotar os eventos ocorridos com os animais nas respectivas fichas de identificação de gaiolas e em livros de registro.
As fichas e os livros devem conter informações suficientes para que se tenha, a cada momento, uma posição exata de tudo o que acontece na colônia, tais como: acasalamentos, datas de nascimento, quantidade de filhotes nascidos, de animais mortos, desmamados etc.

Para Facilitar o Registro da Colônia

Contenção – a forma mais segura de conter um coelho é pegando-se com uma das mãos a pele do pescoço e com a outra as patas traseiras, segurando-o junto ao corpo.
Para grandes trajetos, coloca-se o animal sobre o antebraço com a cabeça dirigida para o corpo, segurando firmemente as patas traseiras. Nunca se deve levantar um coelho pelas patas ou pelas orelhas, pois são propensas a lesões de coluna vertebral e freqüentes fraturas.
Os coelhos também podem ser controlados por uma forma de hipnose física, por meio de carícias muito delicadas, que permite sua tranqüilidade por algum tempo.
Para inoculação ou retirada de sangue da veia marginal da orelha, utilizamos caixa apropriada para contenção.

Anestesia – os anestésicos devem ser utilizados sempre que necessário, obtendo-se maior facilidade e tempo de manipulação do animal.
Os anestésicos por inalação, halotano e metoxiflurano, podem ser administrados com segurança, utilizando-se equipamentos adequados. No entanto, seu uso não é de rotina em animais de experimentação, em razão do custo e da necessidade de equipamento especial, bem como de técnico especializado.

Quadro 3 – Medicação pré-anestésica para coelho

DROGA	DOSAGEM	VIA DE ADM.	EFEITO
Sulfato de Atropina	0,04 - 0,1 mg/kg	I.M e I.V.	–
Acetil Promazina	1,0 mg/kg	I.M	tranqüilizante por 30-60 min.
Clorpromazina	25 mg/kg	I.M	Tranqüilizante
Diazepan	5-10 mg/kg	I.M.	sedação 60-100 min.
Propiopromezine	5-10 mg/kg	I.M.	Tranqüilizante
Ketamina HCl	20-44 mg/kg	I.M.	Imobilização
Kylazina	3-5 mg/kg	I.M.	Sedação

Fonte: *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (1984).

Quadro 4 – Anestésicos injetáveis para coelhos (hipnóticos/sedativos)

DROGA	DOSAGEM	VIA DE ADM.	EFEITO
Ketamina HCl + Xylazina	35 mg/kg + 5 mg/kg	I.M.	Sedação por 20-70 min.
Fentanyl / Droperidol (Innovar. vet)	0,17 ml/kg	I.M.	sedação
Fentanyl / Fluanisone	0,3 -0,5 mg/kg	I.M.	Sedação – anestesia
Pentobarbital	20-40 mg/kg	I.V.	anestesia
Thiopental	50 mg/kg	I.V.	anestesia por 5-10 min.
Thiamylal	22-54 mg/kg	I.V.	anestesia por 5-10 min.

Fonte: *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (1984).

Referências Bibliográficas

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

National Ressearch Council. *Nutrient Requirements of Laboratory & Animals*. 3nd ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1978.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). *Temas Seleccionados sobre Medicina de Animales de Laboratório: el conejo*. Rio de Janeiro: CPFA/OPS/OMS, 1976. (Serie de Monografias Cientificas y Tecnicas)

Bibliografia

De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Menéndez, R. C. *Animales de Laboratorio en las Investigaciones Biomedicas*. Habana: Editorial Ciências Médicas, 1985.

POILEY, A. M. A Systemic Method of Breeder Rotation for Nom-Inbred Laboratory Animal Colonies. *Proc. Anim. Care Pan.*, 10(4):159-166, 1960.

SAIZ MORENO, L.; GARCIA DE OSMA, J. L. & COMPAIRE FERNANDEZ, C. *Animales de Laboratorio: producción, manejo y control sanitario*. Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias/Ministerio da Agricultura, Pesca y Alimentacion, 1983.

UNIVERSITIES FEDERATION FOR ANIMAL WELFARE (UFAW). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 5th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1976.

13

Principais Doenças dos Coelhos

Andréa Mendes Pereira

Introdução

Os coelhos são afetados por uma variedade de doenças que podem interferir na sua utilização na experimentação, o que os torna, nesse caso, um elemento biológico inferior, aumentando consideravelmente o custo da investigação. As doenças que mais comumente afetam os coelhos são as do trato respiratório e as intestinais. Muitas dessas doenças estão presentes na colônia de forma subclínica e podem aparecer como surtos em conseqüência do estresse provocado por mudança de manejo, transporte ou pela manipulação durante a experimentação.

Os animais portadores de agentes infecciosos, mesmo que de forma latente, constituem focos potenciais de infecção. O controle das enfermidades pode ser mais eficaz se forem adotadas práticas de manejo que desfavoreçam a transmissão direta dos agentes. Aconselha-se evitar a troca de comedouros e bebedouros, manutenção de número adequado de animais por gaiola e não manter animais de diferentes espécies na mesma sala.

A quarentena dos animais recentemente introduzidos na colônia constitui medida indispensável no controle de enfermidades. Esse período não deve ser menor que 14 dias e, nessa época, os animais devem ser minuciosamente examinados diariamente em busca de sinais que apontem a presença de doença.

O coelho saudável é alerta e bem provido de carne. As patas dianteiras são paralelas entre si, ao passo que as traseiras se flexionam sob o corpo. O metatarso é que está em contato com o piso da gaiola, portanto, é o que suporta boa parte do peso do animal. As orelhas são móveis, voluntária e independentemente, e alertas a qualquer ruído estranho.

Doenças Infecciosas de Origem Bacteriana

Pasteurelose

A pasteurelose é uma doença respiratória contagiosa muito importante nos coelhos, caracterizada por infecção do trato respiratório superior com rinite e conjuntivite crônicas e mucopurulentas.

O agente etiológico é *Pasteurella multocida,* que também afeta outros animais domésticos e de laboratório. Na cobaia, determina severa pneumonia. *Bordetella bronchiseptica* e *Haemophilus* sp podem estar associados como agentes secundários.

A transmissão ocorre por contato direto com animais infectados, ou indiretamente por intermédio de equipamentos contaminados, aerossóis e pelo técnico. Há transmissão sexual.

Os sintomas variam desde uma ligeira descarga nasal não-progressiva até uma septicemia aguda e morte. Geralmente as anormalidades das vias respiratórias superiores são os achados mais freqüentes, sendo característica a descarga nasal mucopurulenta acompanhada de espirros. A doença pode se sustentar com esse quadro por longos períodos, propagando-se rapidamente pela colônia. A evolução para formas mais severas acontece quando a resistência imunológica do animal fica prejudicada. Nos casos mais severos, evidencia-se broncopneumonia com estertores audíveis durante a contenção do animal. O quadro tem curso agudo e fatal.

A conjuntivite é um sintoma comum, proveniente da contaminação do ducto naso-lacrimal, mas geralmente é benigna. A pasteurelose também pode causar otite média com desvio do pescoço. Ocasionalmente, ocorrem abscessos subcutâneos que, mesmo encapsulados, podem causar septicemia. Nas infecções genitais resultantes de transmissão sexual, as fêmeas desenvolvem metrites e piometra, ao passo que os machos apresentam orquites.

As lesões encontradas no exame *post mortem* variam desde ligeira inflamação dos condutos nasais até pneumonia severa. Os pulmões podem estar normais, firmes ou edemaciados de cor roxa escura a acinzentada, com abscessos disseminados ou focais. Há acúmulo de fibrina nas superfícies pleural e pericárdica.

Microscopicamente, são vistos acúmulos extensos de exudato purulento que, dependendo da severidade, podem obstruir completamente a árvore respiratória. Observam-se também áreas focais ou disseminadas de necrose e hemorragia.

O diagnóstico é confirmado pelos sintomas, pelas lesões anatomopatológicas e isolamento do agente. O tratamento baseado na antibioticoterapia é de baixa eficácia.

O único método eficaz de erradicação da doença é o descarte de toda a colônia, esterilização dos equipamentos e da sala, além da obtenção de animais isentos da infecção. A utilização de vacinas preparadas com antígenos capsulares do agente demonstrou algum êxito na prevenção da doença. A criação de animais livres de patógenos específicos constitui o método mais efetivo e prático para se prevenir a instalação da pasteurelose na criação de coelhos.

Doença de Tyzzer

Trata-se de uma enfermidade comum entre os camundongos e pode provocar surtos graves em colônias de coelhos. É causada pelo *Bacillus piliformis*, transmitido por contato oral direto, mas é necessária a ocorrência de alguma condição debilitante para desencadear a doença. As idades de 3 a 12 semanas são as mais susceptíveis.

O quadro clínico é caracterizado por diarréia líquida a mucóide, profusa e espontânea, seguida de morte num período que varia de 12 a 72 horas.

No exame *post mortem*, observam-se lesões necróticas no intestino, cólon proximal, íleo distal, fígado e miocárdio. Supõe-se que o foco primário da infecção seja o intestino e, a partir daí, o agente invade outros órgãos através da via linfática.

O diagnóstico é confirmado com base na visualização do agente no citoplasma das células próximas às lesões necróticas, utilizando colorações especiais nas amostras (PAS, Giemsa, Warthin Starry, Leviditti).

Como medida de controle, deve ser evitada qualquer condição que possa favorecer o estresse entre os animais.

Salmonelose

É uma doença zoonótica que ocorre na maioria das espécies animais, sendo rara em colônia de coelhos. Os agentes etiológicos, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteriditis*, são transmitidos através de alimentos e água contaminados por fezes de outros animais doentes ou portadores assintomáticos.

A doença não determina sintomas específicos. Os animais doentes se curvam, apresentam diarréia e debilidade geral crescente. As lesões incluem: esplenomegalia, congestão e petéquias no baço, pequenos focos de necrose no fígado, ulceração do intestino e enterite hemorrágica.

O diagnóstico é concluído a partir do isolamento *in vitro* do agente e identificação do mesmo mediante provas bioquímicas.

O tratamento não é recomendado, visto que induz ao estado de portador, facilitando a disseminação da doença. O controle se baseia na utilização de boas práticas de higiene e manejo, eliminação de animais doentes e portadores. A transmissão ao homem pode ser evitada com a adoção de hábitos de higiene pessoal adequados.

Necrobacilose

É uma doença pouco comum em coelhos, causada pelo *Bacillus fusiformis*, sendo a maioria dos animais susceptíveis à doença. O agente é um habitante normal da pele e penetra no organismo através de solução de continuidade.

A enfermidade se caracteriza por ulcerações progressivas da pele e tumorações subcutâneas, sobretudo na face e na cavidade bucal. Pode ocorrer necrose local, edemas, crostas e abscessos. O quadro pode evoluir para linfadenite e pneumonia. O sintoma mais marcante é a dificuldade para comer nos animais afetados.

O diagnóstico é clínico e através do isolamento do agente. O tratamento é fundamentado na drenagem cirúrgica e antibioticoterapia com penicilina intramuscular.

Geralmente, boas práticas de manejo e higiene ajudam a controlar essa enfermidade. O homem pode servir de fonte de infecção, quando não se adotam bons hábitos de higiene pessoal, visto que o agente também habita o organismo humano.

Pseudotuberculose

É mais comum entre os coelhos selvagens. O agente etiológico é *Yersinia pseudotuberculosis*, transmitida por roedores selvagens, eliminada nas fezes, penetrando por via oral. Para os coelhos de laboratório, a via de infecção é a ingestão de água e ração contaminada com fezes de roedores selvagens.

Clinicamente, observa-se uma depreciação geral do estado físico, inchaço nas articulações e, muitas vezes, nódulos abdominais tornam-se palpáveis. Na fase terminal, nota-se emaciação, anorexia e dispnéia. A doença se propaga lentamente através da colônia. Na necropsia, observam-se nódulos caseosos por todos os gânglios e órgãos linfáticos. Baço, fígado, pulmões e intestino estão quase sempre afetados. Às vezes ocorrem lesões articulares. As lesões microscópicas são semelhantes às da tuberculose.

O diagnóstico é baseado nas lesões e no isolamento do agente. Nenhum tratamento é recomendado, devendo-se sacrificar todos os animais doentes. A prevenção da entrada de roedores selvagens na colônia e aquisição de cama, água e ração de fontes confiáveis são medidas indispensáveis no controle dessa enfermidade.

Espiroquetose

Doença raramente diagnosticada em coelhos, específica dessa espécie, causada por *Treponema cuniculi*, transmitida durante o coito.

Essa enfermidade venérea se caracteriza pela presença de áreas erosivas, ulceradas ou por pequenas pápulas nas áreas desprovidas de pêlo da genitália externa. As lesões podem estender-se ao tarso, lábios, narinas, orelhas e conjuntivas.

Microscopicamente, as lesões se apresentam como ulceração, edema, hiperqueratose e infiltrado inflamatório ao redor das áreas de necrose e dos folículos pilosos.

O diagnóstico diferencial para sarna e queimaduras deve ser providenciado. O agente pode ser revelado nas lesões por colorações por prata ou microscopia de campo escuro. O tratamento com penicilina permite manter os animais recuperados em reprodução.

Tularemia

Apesar de ser uma enfermidade significante apenas entre os coelhos selvagens, trata-se de uma zoonose fatal para o homem. O agente etiológico é *Francisella tularensis*, transmitida por contato direto com animais doentes ou por picada de artrópodes hematófagos, podendo penetrar na pele intacta ou na conjuntiva.

A doença determina o aparecimento de focos esbranquiçados puntiformes espalhados por todo o fígado, baço e linfonodos. Microscopicamente, as lesões têm aspecto caseoso no centro, circundadas por linfócitos, neutrófilos e macrófagos.

O diagnóstico é confirmado pelo cultivo e isolamento do agente; não se recomenda qualquer tratamento.

O controle está baseado na eliminação dos animais doentes, na prevenção da entrada de animais selvagens e insetos vetores na colônia e no uso de equipamento de proteção individual pelos técnicos de sala.

Tuberculose

É uma doença rara entre os coelhos, tendo sido constatados alguns casos isolados, em que a infecção foi adquirida através da ingestão de leite de vacas infectadas e de alimentos contaminados por fezes de aves infectadas. A enfermidade determina um quadro granulomatoso nos pulmões, fígado e baço. A prova intradérmica não é confiável.

Pseudomonas

Pseudomonas aeruginosa é um agente etiológico comum às diversas espécies animais, mas tem maior importância para os ratos e camundongos.

A doença se desenvolve a partir da exposição a animais portadores ou a fontes de água contaminada. Os sintomas são debilidade geral, diarréia, disfunção respiratória e morte súbita.

As lesões freqüentemente encontradas são pneumonia e enterite, mas podem haver casos agudos sem lesões em conseqüência de toxemia (o microorganismo produz uma exotoxina).

O diagnóstico é feito pelo isolamento do germe a partir de secreções respiratórias, conteúdo intestinal ou das lesões pulmonares.

O controle da enfermidade é promovido pelo tratamento adequado da água (1,5 a 2 ppm de cloro livre e/ou acidificação até pH 2,5) e do equipamento provedor de água, eliminação dos animais doentes, prevenção e controle do estresse, principalmente durante a experimentação.

Mastite

Ocorre freqüentemente em coelhas em lactação ou naquelas que desenvolvem pseudociese. Os agentes geralmente isolados da lesão são *Staphylococcus* sp e *Streptococcus* sp. A causa primária dessa condição está, na maior parte das vezes, envolvida com traumatismo, porém alguns fatores, como grades da gaiola, cama suja, lesões de mamilo, causadas pela própria cria e retenção de leite, favorecem o aparecimento do quadro. A infecção pode se disseminar com os láparos.

As fêmeas acometidas apresentam anorexia, febre (> 40,5 °C), sede acentuada e uma ou mais glândulas mamárias hiperêmicas, firmes, inchadas e de cor azulada.

O tratamento consiste na administração de penicilina por via intramuscular durante 7 dias. O controle se baseia na prevenção dos fatores predisponentes.

Doenças Infecciosas de Origem Viral

Varíola dos Coelhos

É uma enfermidade altamente contagiosa, determinada por uma espécie de vírus do grupo da varíola, adaptada ao coelho. Esse vírus pode ser transmitido por contato direto ou através de equipamentos/materiais e durante a manipulação de tratadores.

A doença pode se manifestar de forma hiperaguda, sem o desenvolvimento de lesões, ou como uma enfermidade menos aguda com formação de lesões típicas de varíola. Na forma mais leve, há aumento dos linfonodos poplíteos, erupção macular, seguida de pápulas por todo o corpo, mais acentuadamente na região inguinal. Mais tarde formam-se crostas amarronzadas que se soltam das pápulas.

Pode haver perda de dentes, lesões nos lábios e palato. Quando o sistema nervoso central é afetado, há paralisia dos esfíncteres urinário e anal. A pneumonia é normalmente a *causa mortis*. Nas fêmeas grávidas e em lactação a doença é mais grave, sendo comum o aborto e anomalias neonatais.

Na forma hiperaguda da doença, o único achado na microscopia é a broncopneumonia. Nas lesões de pele, podem ser observados invasão mononuclear, necrose e edema.

O diagnóstico é concluído pelos sintomas clínicos e pela sorologia. Não existe tratamento, sendo a vacinação a medida de controle mais eficaz, além da manutenção de boas práticas de manejo.

Mixomatose

É uma doença extremamente fatal (mortalidade 100%), causada por um vírus do grupo da varíola, que tem um artrópode como vetor (mosquitos, ácaros, pulgas, piolhos e moscas).

O período de incubação varia de 7 a 10 dias e os sintomas se iniciam com febre, descarga ocular serosa e blefaroconjuntivite, que culmina com descarga mucopurulenta e edema e pus nos olhos. Tumorações subcutâneas se desenvolvem no nariz, lábios, orelhas e aberturas genitais, em forma de pápulas vesiculadas e gelatinosas, que tendem a se generalizar. Após 2 a 5 dias o animal vem a óbito.

As tumorações estão freqüentemente aderidas à musculatura adjacente. Apresentam aspecto mucóide, gelatinoso e cor avermelhada. Os linfonodos estão aumentados e hemorrágicos. Há petéquias na superfície do baço e esplenomegalia. Broncopneumonia, orquite e epididimite são lesões comuns. Microscopicamente, ocorre hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais, cujo citoplasma está vacuolado com grânulos eosinofílicos. A derme é mixomatosa e tem grandes células em fuso que representam fibroblastos hipertrofiados.

O diagnóstico é concluído com base nos dados clínicos, epidemiológicos e anatomopatológicos. Não há tratamento disponível. O controle é obtido pela prevenção de insetos e sacrifício dos animais doentes.

Fibroma de Shope

Esta enfermidade não é comum entre os coelhos de laboratório, porém sua importância reside na antigenicidade cruzada do vírus do Fibroma de Shope com o vírus da Mixomatose, podendo o primeiro promover imunidade de até 6 meses para a mixomatose. O vírus do Fibroma de Shope, também pertencente ao grupo da varíola, é transmitido por mosquitos ou ácaros vetores.

O quadro clínico da doença é caracterizado por nódulos subcutâneos únicos ou múltiplos, e os órgãos genitais podem estar edemaciados. A doença tem curso fatal principalmente para os láparos, enquanto os adultos podem se recuperar espontaneamente dos tumores subcutâneos.

Na necropsia, as tumorações podem estar presentes também nos rins, fígado, medula óssea e mesentério. Microscopicamente, os tumores têm aspecto mixofibromatoso com inclusões citoplasmáticas eosinofílicas.

O diagnóstico definitivo é obtido após provas sorológicas, porém o quadro clínico e epidemiológico colaboram na elaboração da suspeita clínica. Não há tratamento, restando a prevenção dos vetores como medida de controle.

Doenças Infecciosas de Origem Fúngica – Dermatofitoses

Tratam-se de doenças pouco comuns nos coelhos. Os agentes que podem estar envolvidos são: *Trichophyton mentagraphytes, Microsporum canis* e *Trichophyton gypseum*. A transmissão ocorre por contato direto com animais doentes.

Clinicamente, observam-se lesões inicialmente na pele da cabeça ou orelhas, que se estendem para outras regiões do corpo. O aspecto é crostoso, hiperêmico, pruriginoso e sem pêlo. Os animais são geralmente acometidos isoladamente, e não em epizootias. Os cortes histológicos das lesões mostram espessamento da epiderme, hiperqueratose e infiltrado mononuclear na derme.

Ressalta-se a necessidade de diagnóstico diferencial para sarna, carência genética de pêlo, muda da pelagem, arrancamento da pelagem de ordem comportamental. O diagnóstico definitivo se faz a partir de raspados de pele em torno da lesão, tratada com KOH a 10%, revelando a presença de formas fúngicas nas células epiteliais e pêlos. O agente pode ser isolado e cultivado em meios próprios para fungos.

A administração oral de griseofulvina (25 mg/kg/dia) durante 14 dias traz bons resultados no tratamento. Como medida de controle, resta isolar e tratar os animais doentes, além de evitar contato com outros animais invasores. O homem pode servir de fonte de infecção como também pode se contaminar, sendo exigida adequada higienização antes e depois de manipular os animais para efetivo controle da doença.

Doenças Parasitárias

Ectoparasitos

Pediculose

Haemodipsus ventricosis é um piolho sugador que raramente acomete os coelhos de laboratório. A parasitose traz como maiores danos uma dermatite no local da picada e um quadro de anemia nas infestações acentuadas.

Confirmada a presença do piolho na base do pêlo durante o exame clínico, o tratamento indicado é a aplicação de compostos inseticidas na pele e no pêlo do animal.

A quarentena dos animais recentemente adquiridos permite prevenir a instalação da doença entre os animais.

Sarna de orelha

Psoroptes cuniculi é um ácaro, parasita do conduto auditivo externo, comumente encontrado nas colônias de coelhos de laboratório, que determina a presença de material crostoso, fibrinoso de cor amarronzada na base da orelha.

Os ácaros são extremamente irritantes, causando prurido intenso. Os animais balançam intensamente a cabeça, chegando a gerar perda de pêlo ao redor do pescoço e lesões por traumatismo. Nos casos mais severos, a dor é intensa e uma otite média pode se desenvolver.

Os ácaros podem ser visualizados durante o exame otoscópico. O tratamento consiste na limpeza do conduto auditivo e na aplicação de óleo mineral com princípio acaricida.

Sarna do corpo

É uma condição rara, porém muito contagiosa, causada pelos ácaros *Sarcoptes scabei* (*cuniculi*) e *Notoedrus cati* (*cuniculi*). As lesões são tipicamente pruriginosas, com áreas hiperêmicas em forma de arranhões.

O raspado de pele da lesão revela a presença do ácaro. O tratamento nem sempre é eficaz e consiste na aplicação tópica de soluções acaricidas. Dessa forma, a medida de controle mais indicada é a eliminação dos animais doentes.

Endoparasitos

Nematódeos

Quadro 1 – Nematódeos considerados incomuns nos coelhos de laboratório

Obeliscoides cuniculi *Graphidium strigosum*	Ciclo vital direto Infecções severas → gastrite hemorrágica, anemia e diarréia
Passalurus ambiguus *Passalurus nonannulatus* *Dermatoys veligera*	Ciclo vital direto Irritação e prurido na região anal
Trichuris leporis	Ciclo vital direto, habita a luz cecal
Capillaria hepatica	Ciclo vital direto Hepatomegalia É uma zoonose

Cestódeos

Raramente se observa parasitismo por esse tipo de helminto nos coelhos de laboratório. Entretanto, vale ressaltar que não existe tratamento eficaz no controle desse tipo de parasitose, sendo o mesmo resultante do isolamento de outras espécies, da oferta de ração industrializada e da manutenção de água e cama afastados de outros animais.

Quadro 2 – Cestódeos encontrados nos coelhos de laboratório

Cittotanenia denticulata *C. pectinata*	Os coelhos são os hospedeiros definitivos e os ácaros são os intermediários.
Cysticercus pisiformis	Forma larval de *Taenia pisiformis* (cão). Os cisticercos podem ser encontrados na cavidade peritoneal do coelho.
Coenurus serialis	Forma larval de tênia *Multiceps serialis*. Os cisticercos são encontrados na musculatura logo abaixo da pele.
Cysticercus fasciolaris	Forma larval de *Taenia taeniaformis* (gato). Os cisticercos se localizam no fígado e cavidade abdominal.
Echinococcus granulosus	Os coelhos e outros mamíferos são hospedeiros intermediários, o cão é o definitivo. Os cistos podem estar no fígado, pulmões, cérebro e linfonodos.

Protozoários

Encefalitozoonose

Doença amplamente distribuída entre os coelhos de laboratório, causada pelo *Encephalitozoon cuniculi*. Também afeta outras espécies como ratos, camundongos, cães e o homem. A transmissão se dá por contato direto, sendo a fonte de infecção a urina dos animais doentes. Nos coelhos já foi constatada a infecção transplacentária. O quadro clínico é aparentemente assintomático.

Lesões macroscópicas estão ausentes. Microscopicamente, evidenciam-se lesões focais no cérebro em forma de pequenos granulomas disseminados, com ou sem necrose. Os granulomas são compostos de células inflamatórias mononucleares com o parasita no seu centro, havendo infiltrado perivascular ao redor dos granulomas. Ocasionalmente, ocorre meningite não supurada. Nos rins, ocorre nefrite intersticial crônica, com fibrose inversamente proporcional ao infiltrado mononuclear. Os parasitas podem estar livres na luz dos tubos renais.

O diagnóstico é geralmente confirmado pelos achados histopatológicos e pela visualização e identificação do parasita nas lesões. O agente deve ser diferenciado de *Toxoplasma gondii*, por diferença de tamanho e por coloração.

Não há tratamento disponível. O controle é efetivo mediante a eliminação dos animais doentes. Apesar de se tratar de uma zoonose, poucos casos foram relatados em seres humanos.

Toxoplasmose

Toxoplasma gondii é transmitido ao coelho por via oral, a partir do contato com fezes de gatos que estejam eliminando oocistos, ou através da transmissão vertical. A doença pode ter curso agudo, crônico ou ser clinicamente inaparente. Os sintomas, quando presentes, dependem da localização das lesões causadas pelo parasita.

As lesões, em geral, caracterizam-se por focos de necrose e edema em qualquer dos órgãos afetados, sendo mais hiperplásicas nos casos crônicos. As localizações mais freqüentes são sistema nervoso central e baço.

O diagnóstico é feito por intermédio de provas sorológicas. Não há tratamento disponível. O controle é baseado na eliminação dos animais doentes e na prevenção de contato com fezes de gatos. Trata-se de uma zoonose de especial importância para mulheres grávidas.

Coccidiose hepática

É uma doença bastante prejudicial para colônias de produção de coelhos, sendo causada pela *Eimeria stiedae*. A via de infecção é oral e a fonte são fezes de animais infectados. O quadro clínico pode ser agudo, crônico ou assintomático. Os animais jovens são mais susceptíveis. Os sintomas, quando presentes, são decorrentes de disfunção hepática.

Na necropsia, são observados nódulos branco-amarelados espalhados pela superfície do fígado, podendo haver fibrose extensa nas infecções severas. Microscopicamente, evidencia-se destruição e hiperplasia do epitélio ductal e dilatação dos canais biliares, com fibrose periductal. Os parasitas estão dentro das células epiteliais dos canais e no exudato cremoso na luz dos canais biliares.

O diagnóstico é feito pela pesquisa dos oocistos nas fezes, mas a necropsia é essencial para confirmação da doença, visto que não é possível diferenciar dos oocistos intestinais. Embora de baixa eficácia, o tratamento consiste na administração oral (na água ou na ração) de sulfonamidas de ação entérica (sulfaquinoxalina, sulfametacina e sulfadiacina), na dosagem de 100 mg/kg a cada 12 horas durante 2 semanas. Boas práticas de manejo e higiene, assim como a eliminação dos animais doentes, associada ao exame de fezes de animais em quarentena, favorecem o controle da doença.

Coccidiose intestinal

Esta enfermidade apresenta caráter misto, podendo estar associada a várias espécies de *Eimeria*: *E. magna, E. irresidua, E. perforans, E. media* e *E. neoleporis*. Esses parasitas atacam a mucosa do duodeno e íleo, determinando destruição do epitélio, necrose, edema e, dependendo da espécie, pode destruir glândulas da submucosa.

Clinicamente, os animais apresentam diarréia mucóide, às vezes com perda de sangue, emagrecimento e desidratação. Como não há o desenvolvimento de imunidade permanente, a doença pode reaparecer em situações de estresse.

O diagnóstico é confirmado pela presença de oocistos nas fezes ou em raspados da mucosa intestinal. O tratamento e controle são semelhantes aos da coccidiose hepática.

Doenças Não-Infecciosas

Má-Oclusão Dentária

Defeitos de oclusão e crescimento exagerado dos incisivos têm etiologia genética para os coelhos. Os reprodutores com tais más-formações devem ser eliminados da criação. Os animais apresentando crescimento exagerado devem ter seus incisivos cortados periodicamente para permitir a apreensão adequada do alimento. A falta de cuidado com esses animais não raro leva à morte por inanição.

Calos de Posição

A manutenção de animais pesados em pisos de arame favorece o desenvolvimento de lesões nas superfícies plantares dos pés, por conta da pressão do peso sobre o piso. Nesses casos, fica indicada a limpeza periódica da gaiola e utilização de material macio sobre o piso a fim de promover um descanso para o animal.

Bibliografia

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to Use and Care of Experimental Animals*. Otawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). *Temas Seleccionados sobre Medicina de Animales de Laboratório: el conejo*. Rio de Janeiro: CPFA/OPS/OMS, 1976. (Serie Monografias Cientificas y Tecnicas)

Criação e Manejo de Camundongos

Belmira Ferreira dos Santos

Origem

O camundongo acompanha o homem por vários milênios; existem registros acerca desse animal com mais de 4 mil anos de idade e até mesmo na *Bíblia*. Em algumas antigas civilizações orientais chegou a ser adorado, embora, na maioria dos casos, tenha sempre sido associado a doenças e a suas atividades de invadir locais destinados à estocagem de alimentos, notadamente grãos.

Sua introdução como animal de laboratório se deveu ao fato de ser pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curto, ser de fácil domesticação e manutenção. Por todas essas características, tornou-se o mamífero mais usado na experimentação mundial.

Assim como o rato, sua origem parece ter sido o continente asiático, mas se difundiu por todo o planeta, acompanhando o homem em suas migrações, já que esse sempre lhe garantiu alimento e 'moradia'.

Por ser tão próximo do homem, acabou por se tornar uma espécie de animal de estimação, não no sentido que empregamos para cães e gatos, mas passou a ser criado por exibir vários fenótipos interessantes. Assim, os camundongos albinos já eram conhecidos muito antes de serem introduzidos em biotérios, além de variantes com colorações inusitadas e distúrbios neurológicos.

Essas qualidades atraíram biólogos da época, envolvidos na redescoberta dos trabalhos de Mendel e começando os estudos em genética. Tendo por base esses pesquisadores, o camundongo se tornou a ferramenta preferida para esses tipos de trabalho. Começaram, então, as tentativas de estabelecimento das linhagens consangüíneas, que atualmente respondem pelo grande número de camundongos utilizados na pesquisa biomédica.

Taxonomia

- Classe: Mammalia
- Ordem: Rodentia
- Família: Muridae
- Gênero: *Mus*
- Espécie: *Mus musculus*

Essa classificação é a mais aceita, mas ainda há bastante controvérsia sobre as espécies e subespécies criadas em laboratório, tendo em vista que, em conseqüência dos cruzamentos especiais, os animais apresentam

alguns genes ou até mesmo cromossomos de espécies diferentes, sendo um exemplo disso a linhagem C57BL/6, em que 6,5% do genoma é originário de *Mus spretus*, e não de *Mus musculus*.

Características

O camundongo tem corpo fusiforme e cauda que pode atingir comprimento maior do que o corpo. Sua coloração natural é marrom escura no dorso, com um ventre mais claro e cinzento. Não possui glândulas sudoríparas. Tanto as patas anteriores como posteriores possuem cinco dedos. Uma característica interessante é que todos os cromossomos do camundongo doméstico são telocêntricos.

Reprodução

Ciclo Estral

Tem a duração de 4-5 dias e se divide em: proestro, estro, metaestro e diestro. O proestro começa com a fase folicular do ovário, que culmina na ovulação, no estro (= cio). O metaestro e o diestro se caracterizam pela fase luteínica do ovário.

O ciclo estral do camundongo também pode ser afetado pelas condições de alojamento do animal. Fêmeas alojadas em gaiolas, em regime de superpopulação, sem a presença de machos, exibirão uma fase chamada anestro, caracterizada pela ausência de ciclos estrais. Quando expostas aos machos ou a seus feromônios, começam a ciclar em 48 horas. A este fenômeno se dá o nome de Efeito de Whitten.

Quando as fêmeas entram em gestação, se expostas a machos de outras linhagens ou seus feromônios durante as primeiras 24 horas, ocorre uma reabsorção em mais de 50% dos embriões. Este é o chamado Efeito de Bruce.

O período de gestação vai de 19 a 21 dias; após o décimo dia, já se observa um aumento no abdômen. A média de filhotes/parto é de 8-10 em linhagens *outbred* e em torno de 5 filhotes/parto em linhagens *inbred*.

Dados Biológicos

O camundongo nasce desprovido de pêlos, com exceção das vibrissas (pêlos táteis), com o corpo avermelhado, de olhos fechados, com o pavilhão auricular fechado e aderido à cabeça e pesando, em média, 1 g.

Após o parto, a fêmea amamenta a ninhada e pode-se visualizar o leite no estômago dos animais pela mancha branca nos seus abdomens. Se precisarmos fazer algum tipo de seleção ao nascimento, esse é um fator importante, já que os animais que mamam, demonstram maior habilidade para sobreviver. Sua pele vai clareando ou escurecendo, de acordo com a coloração da linhagem, e os pêlos começam a aparecer por volta do 3º ou 4º dias.

Com uma semana de idade seus corpos já estão totalmente recobertos de pêlos e as tetas tornam-se visíveis nas fêmeas. As orelhas começam a se afastar da cabeça e a se abrir por volta do 3º dia de idade. Aos 10 dias de idade, os animais abrem os olhos e aos 15 dias já começam a se alimentar de sólidos (ração) que a mãe traz para o interior da gaiola. Estão aptos ao desmame a partir dos 18 dias, mas em muitas linhagens consangüíneas, por causa de seu pequeno tamanho, o desmame se dá com 4 semanas de idade. No ato do desmame, são sexados, separados e pesados. O peso médio aos 21 dias situa-se, em torno de 10-12 g, para camundongos *outbred* e 8-10 g, para camundongos *inbred*. A sexagem desses animais se baseia na distância ano-genital e pela visualização

da bolsa escrotal. A puberdade se dá dos 30 aos 40 dias e a maturidade sexual por volta dos 50-60 dias. O acasalamento, geralmente, ocorre nesse período e os animais costumam pesar em torno de 18-20 g, para animais *outbred* e 15-18 g, para animais *inbred*.

Os animais permanecem em reprodução por mais ou menos um ano e podem atingir pesos de 40 g para machos *outbred* e 30-35 g para fêmeas *outbred*. Os animais *inbred* atingem pesos menores e dificilmente passam de 35 g.

Manejo de Colônias

O estabelecimento de uma colônia em um biotério obedece a várias considerações. Se mantivermos colônias únicas ou pretendermos a auto-suficiência, teremos de estabelecer três diferentes colônias para cada linhagem instalada.

Colônia de Fundação ou Produtora de Matrizes ou Piloto

É a primeira colônia que se estabelece e tem como finalidade se autoperpetuar (*self-perpetuation*), possibilitando sua própria manutenção. Nela, todos os acasalamentos são monogâmicos permanentes, com animais identificados individualmente e registrados, para que possamos determinar índices reprodutivos e informações que lhe conferirão um perfil único. Isso nos ajudará na seleção dos futuros reprodutores, além de estabelecer parâmetros para a seleção e o descarte zootécnico, como intervalos entre partos, número de partos/fêmea, número de filhotes/ninhada/fêmea etc.

No caso do estabelecimento de uma colônia *outbred*, o número de casais deverá ser relativamente grande, para que a heterozigose e a freqüência gênica possam ser asseguradas. A primeira deverá ser alta e a segunda, constante. Para que isso ocorra, os acasalamentos são monogâmicos e permanentes, e cada casal contribui somente com um novo casal para a geração seguinte. Tal cuidado nos assegura a manutenção da freqüência gênica da colônia. Todos os casais têm fichas de registro. As colônias devem ser 'fechadas', isto é, a introdução de novos animais deve ser evitada, depois da sua formação, uma vez que cada animal que se introduz modifica a freqüência gênica da colônia e pode aumentar ou diminuir a heterozigose. Esse fato, a longo prazo, aumenta a homozigose, que é mantida no mínimo possível pelos sistemas de acasalamento já descritos anteriormente. O grau de consangüinidade será diretamente proporcional ao número de casais cujos descendentes forem escolhidos para formar a geração seguinte. Estudos têm mostrado que o tamanho da população e o método de reposição de reprodutores escolhidos são decisivos na manutenção da estrutura genética da colônia *outbred*. Para assegurarmos que os futuros reprodutores sejam provenientes de toda a população, vários sistemas rotacionais são empregados atualmente.

No estabelecimento de colônias *inbred*, estas possuem um pequeno número de casais (em torno de 15 a 20) e todos eles remontam a um ancestral comum. Os acasalamentos são sempre monogâmicos permanentes e cada casal contribui com quantos casais forem necessários para a próxima geração. Todos os casais são registrados no *pedigree* da linhagem.

Colônia de Expansão

É a segunda colônia a ser formada, e somente no caso do estabelecimento de animais consangüíneos. Sua finalidade é ampliar a produção de matrizes, já que as colônias de fundação consangüíneas têm reduzido número de casais. É constituída por animais que vêm da colônia de fundação, mas também pode produzir seus próprios casais para reposição. Os acasalamentos são sempre monogâmicos permanentes. Os casais têm registro, mas não no *pedigree* da linhagem.

Colônia de Produção

É a terceira colônia a ser formada e sua finalidade é a de produzir animais suficientes para atender à demanda dos usuários, de acordo com suas especificações. Nela, podem conviver os vários tipos de acasalamentos: monogâmicos ou poligâmicos, permanentes ou temporários, dependendo dos animais a serem produzidos. Os casais e/ou haréns vêm das colônias de fundação (nas colônias *outbred*) ou das colônias de fundação e expansão (nas colônias *inbred*). Os acasalamentos são realizados ao acaso e os casais não têm registro completo, já que o que importa são a data de acasalamento e os dados das ninhadas, para o posterior descarte zootécnico. Nenhum animal originário dessa colônia é utilizado como reprodutor.

Bibliografia

Foster, H.; Small, D. & Fox, G. (Eds.). *The Mouse in Biomedical Research*. New York: Academic Press, 1983.

Green, E. H. *The Biology of Laboratory Mouse*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1966.

The Jackson Laboratory. *Handbook on Genetically Standardized JAX MICE*. 5th ed. Bar Harbor: The Jackson Laboratory, 1997.

Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1986.

Criação e Manejo de Ratos

Belmira Ferreira dos Santos

Origem

O rato de laboratório, *Rattus norvegicus*, usado atualmente na maioria dos biotérios e infectórios, deriva de colônias desses animais, originárias dos EUA. Embora seja originário de regiões da Ásia Central, acompanhou o homem em seu avanço pelos continentes, sendo encontrado, hoje em dia, em praticamente todas as latitudes.

Acredita-se que tenha sido a primeira espécie de mamífero domesticada para fins científicos, pois desde o início século XX já era usado em pesquisas nutricionais. A grande difusão desse animal na pesquisa se deu com Henry H. Donaldson. Ao aceitar uma posição no Wistar Institute, na Filadélfia, ele criou uma equipe que se dedicou a padronizar colônias de rato a partir de quatro casais de albinos, os quais ele trouxera de Chicago, e a elaborar tabelas com os dados e a biologia dos animais. Entre os seus trabalhos, merece menção *The Rat: data and reference tables for the albino rat and the norway rat*, publicado em 1915.

Pela equipe do Dr. Donaldson, várias linhas consangüíneas de ratos conhecidas atualmente se formaram, como o PA, Lewis, e o Brown Norway. Ao mesmo tempo que estas, a linhagem *outbred* Wistar também começou a ser formada e a ser distribuída, não só para outros institutos americanos, mas também para outros países.

Entre outros pesquisadores importantes para a disseminação do rato como animal de laboratório encontramos Osborne e Medel, que se dedicaram à nutrição, em especial ao estudo dos aminoácidos e das vitaminas. A colônia albina por eles estabelecida era mantida por acasalamentos ao acaso e os animais se caracterizavam pelo grande tamanho. Long e Evans estudaram o ciclo estral do rato e suas implicações. Para tais estudos, desenvolveram uma linhagem obtida do cruzamento de ratas provenientes do Instituto Wistar com um macho cinzento silvestre que havia sido capturado.

Taxonomia

- Classe: Mammalia
- Ordem: Rodentia
- Família: Muridae
- Gênero: *Rattus*
- Espécies: *Rattus norvegicus*
  Rattus rattus

Embora o gênero *Rattus* compreenda 137 espécies, do ponto de vista de animais de laboratório apenas duas têm importância: *R. norvegicus* (rato doméstico ou rato marrom) e o *R. rattus* (rato preto).

O interesse na manutenção de ratos em cativeiro começou com as 'lutas': os animais eram colocados em uma arena e cães da raça *terrier* eram treinados para matá-los, era considerado vencedor o cão que conseguisse matar a maior quantidade de ratos no menor tempo. Desde então, por serem considerados mais dóceis e fáceis de lidar, os exemplares albinos começaram a ser mantidos.

Características

O rato tem um corpo fusiforme e uma cauda que em muitas raças/linhagens pode chegar a medir mais em comprimento do que o próprio corpo. Tanto as patas anteriores como posteriores possuem cinco dedos. Assim como outros roedores, não possuem glândulas sudoríparas. Em ambientes quentes, procuram locais com sombras ou cavam tocas que costumam ser mais frias do que a superfície. Adaptam-se melhor ao frio. Também não possuem vesícula biliar.

Reprodução

Ciclo Estral – tem a duração de 4-5 dias e se divide em:

- proestro: tem duração de 12 horas. Podemos observar uma pequena tumefação na vulva e a mucosa vaginal se apresenta ressecada;
- estro: tem duração de 12 horas e a tumefação da vulva chega ao máximo;
- metaestro I: tem duração de 15 horas e, além da tumefação da vulva começar a diminuir, podemos observar uma massa caseosa na vagina;
- metaestro II: tem duração de 6 horas e a vulva volta ao normal. A mucosa vaginal se apresenta úmida;
- diestro: tem duração de 57 horas e a vulva continua normal. A mucosa vaginal se apresenta úmida.

O período de gestação se estende de 19 a 22 dias. Após o décimo dia, já se pode observar o aumento de volume do abdômen. Casos de distorcias são raros e o parto dura, em média, de 1 a 2 horas. A média de filhotes/parto é de 8, para o rato Wistar, mas podemos encontrar ninhadas com até 16 filhotes.

Dados Biológicos

O rato nasce desprovido de pêlos, com exceção das vibrissas (responsáveis pelo tato), e com o corpo avermelhado; com os olhos fechados, o pavilhão auricular também fechado e aderido à cabeça e pesando de 4 g a 6 g. Após o parto, a fêmea amamenta a ninhada. Esse fenômeno pode ser observado através da mancha branca no abdômen dos animais, que nada mais é do que leite no estômago. Tal fato é importante, já que os filhotes mais fracos não mamam e, portanto, em casos de seleção ao nascimento, este, além da robustez do animal, é um fator de descarte.

A pele dos animais vai clareando ou escurecendo, de acordo com a coloração da linhagem, e os pêlos começam a despontar por volta do 3º ao 4º dia de vida. Com sete dias o corpo está totalmente recoberto de pêlos, as tetas são visíveis nas fêmeas e as orelhas já começam a se afastar da cabeça e a se abrirem. Por volta do 10º dia os animais abrem os olhos. Aos 16 dias já começam a se alimentar independentemente e dos 18 aos 24

já estão aptos ao desmame. Nessa idade, são sexados, geralmente pesados e separados. O peso ao desmame varia de 35 g a 45 g e a sexagem é feita baseada na distância ano-genital, que no macho é bem maior do que na fêmea, além da visualização da bolsa escrotal.

A puberdade se dá aos 30 dias e a maturidade sexual, dos 50 aos 60 dias. Em geral, o acasalamento ocorre nesse período, quando os machos já pesam de 200 g a 250 g e as fêmeas, de 150 g a 180 g.

Os animais permanecem em reprodução até os 9 meses de idade. Os machos podem pesar de 500 g a 600 g e as fêmeas, de 300 g a 400 g.

Manejo de Colônias

Para estabelecermos uma colônia em um biotério de criação, devemos levar em consideração várias questões. A mais importante: iremos nos tornar auto-suficientes na produção dos animais? Uma vez decidido que sim, começaremos a montar nossa colônia, constituída por duas ou três, com finalidades diversas. São elas:

- Colônia de Fundação ou Produtora de Matrizes ou Piloto;
- Colônia de Expansão;
- Colônia de Produção.

Essa descrição das colônias já foi feita no capítulo referente à criação de camundongos.

Bibliografia

Baker, H.; Lindsey J. & Weisbroth, S. (Eds.). *The Laboratory Rat*. New York: Academic Press, 1979.

Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1986.

16

Criação e Manejo de *Hamsters*

Belmira Ferreira dos Santos

Origem

O *hamster* é relativamente novo como animal de laboratório. Os primeiros a serem usados foram os *hamsters* chineses. Em 1919, foi descrito, em um trabalho científico, sua susceptibilidade à *Leishmania*, o agente do calazar. Entretanto, a manutenção desses animais era difícil e sua reprodução em cativeiro pouco satisfatória, o que implicava novas e sucessivas importações da China. Além disso, os animais não forneciam dados satisfatórios nos estudos da leishmaniose mediterrânea.

A procura de um modelo mais adequado levou pesquisadores da Universidade de Jerusalém a irem em busca, no campo, de uma nova espécie de *hamster*. A Síria foi o território escolhido para essa procura. Dez jovens animais e sua mãe foram encontrados em uma toca, num campo de trigo, próxima a Aleppo. Um deles morreu e outros cinco conseguiram escapar antes do envio à universidade. Os animais remanescentes se adaptaram bem ao cativeiro e se mostraram prolíferos. Após curto período, foi estabelecida uma colônia de laboratório e vários exemplares foram enviados a laboratórios na Europa e nos Estados Unidos, onde colônias foram formadas. Estima-se que o número de *hamsters* usados na pesquisa biomédica, atualmente, iguale ao de cobaias e coelhos. Esses animais foram denominados *hamsters* sírios (*Syrian hamsters*), em virtude do local onde foram encontrados, e mais tarde, a esta, juntou-se a denominação dourado, devido a sua cor.

Por esse histórico, nota-se que a maioria dos *hamsters*, mantidos em laboratório ou como animais de estimação, descendem dessa ninhada, embora haja registros de capturas posteriores de animais na Síria, tais como o grupo de 12 animais que foram capturados, em 1971, e enviados ao Massachusetts Institute of Technology (MIT). Descendentes desses animais são mantidos nas colônias do National Institutes of Health (NIH) até os dias atuais.

Apesar de o *hamster* sírio ser denominado 'o *hamster* de laboratório', outras espécies também foram e continuam a ser usadas. A eleição do *hamster* sírio deve-se ao fato de que possui tamanho intermediário, adapta-se muito bem ao cativeiro e tem um comportamento mais dócil do que outras espécies.

Taxonomia

A classificação do *hamster* tem sido um pouco conturbada; muitas vezes os nomes comuns não designam o animal a que nos referimos, pois, na Síria, vivem pelo menos três espécies e, na China, mais de sete. Isso gerou muita discussão na sua taxonomia e até a suspeita de que esses animais fossem híbridos naturais, não espécies.

Atualmente o *hamster* sírio dourado se classifica como:
- Classe: Mammalia
- Ordem: Rodentia
- Família: Cricetidae
- Gênero: *Mesocricetus*
- Espécie: *Mesocricetus auratus*

Características

O *hamster* dourado, diferentemente de outros roedores, é um animal de corpo compacto e cauda muito curta. Seu comprimento, quando adulto, situa-se em torno de 15 cm a 17 cm, e seu peso entre 85 g a 120 g. O pêlo é curto e avermelhado no dorso – daí o nome dourado – enquanto o ventre é completamente cinzento; os olhos são escuros; a pele é extremamente flácida e, como característica mais marcante, possui bolsas laterais (bolsas guturais) no interior da boca, onde estoca alimentos, quando em suas buscas, geralmente por grãos. O alimento, aí estocado, não sofre processo digestivo e depois é expelido no local onde ficará armazenado. É sabido que mães com recém-natos, quando ameaçadas, 'escondem' seus filhotes nessas bolsas.

São excelentes escavadores e vivem em tocas profundas, geralmente sozinhos, somente se encontrando no período de acasalamento. Tanto os machos quanto as fêmeas são bastante agressivos. São animais noturnos e preferem temperaturas mais altas, podendo hibernar quando a temperatura cai. Sua área de distribuição natural é uma região restrita a Aleppo e seus arredores.

Têm também duas glândulas laterais no flanco, de coloração escura, bastante visíveis no macho, menores e menos visíveis na fêmea. Estas são glândulas sebáceas que estão associadas à transformação de testosterona em di-hidrotestosterona e têm sido consideradas como características sexuais secundárias nos machos.

Na fêmea, a uretra tem uma abertura separada e localizada na parte superior da abertura vaginal. A vagina apresenta duas pequenas bolsas laterais, nas quais células epiteliais e leucócitos se acumulam. Por essa razão, devemos ter bastante cuidado quando realizamos o esfregaço vaginal, para evitar erros, por coleta incorreta de material, nas fases de ciclo.

O estômago desses animais é dividido em duas áreas distintas: a área pilórica e a área glandular, separadas por uma constrição semelhante a um esfíncter que regula o fluxo dos alimentos. A área pilórica se assemelha histológica e estruturalmente ao rumem, e a área glandular ao estômago dos monogástricos.

Reprodução

Ciclo Estral

- PROESTRO: tem duração de 3 horas. No esfregaço vaginal, podemos notar raros ou total ausência de leucócitos.
- ESTRO: tem duração de 12 horas. A ovulação ocorre, geralmente, 8 horas após o início do estro. Durante essa fase, a fêmea assume uma lordose característica para aceitar o macho.
- METAESTRO: tem duração de 4 horas. Notamos a presença de secreção de coloração branco-opaco na vagina (secreção pós-ovulatória).
- DIESTRO: tem duração de 72 horas. No início, observamos o surgimento de leucócitos no esfregaço vaginal que se tornam abundantes na metade da fase desse estágio. A secreção vaginal se torna intensa e adquire aspecto seroso. No final desse estágio, os leucócitos começam a desaparecer e a secreção vaginal termina.

O período de gestação é de aproximadamente 16 dias; é aconselhável que fêmeas próximas ao parto não sejam manuseadas, pois são extremamente irritadiças e o manuseio pode levar ao canibalismo ou à asfixia dos filhotes que são 'escondidos' nas bolsas guturais. A média de filhotes/ninhada é de 8, mas podemos encontrar ninhadas com até 16 filhotes. O número médio de tetas, no *hamster*, é de 14, mas recomendamos deixar somente até 10 animais com as mães para que haja menor desgaste e para que sejam mais robustos ao desmame.

Dados Biológicos

Ao nascimento, os animais são avermelhados, desprovidos de pêlos, com exceção das vibrissas (órgãos do tato) – possuem os olhos e o pavilhão auricular fechados, sendo este aderido à cabeça. Pesam, em média, 3 g. Já nascem com os dentes incisivos e ingerem alimentos sólidos ao final da primeira semana de vida.

Após o parto, a fêmea amamenta os filhotes e podemos observar o leite no estômago através de uma mancha branca no abdômen dos animais, que permanecem em reprodução até 1 ano de idade. Os animais podem ser sexados, ao nascer, pela distância ano-genital, que é maior nos machos.

A pele vai escurecendo e aos três dias de idade os pêlos começam a nascer. Por volta de uma semana, já estão totalmente recobertos de pêlos, com a coloração da linhagem ou espécie, e é possível visualizarmos as tetas nas fêmeas. As orelhas começam a se abrir entre o 4º e o 5º dia. Os olhos se abrem entre o 10º e o 12º dia. Nessa fase, é aconselhável supri-los com água, já que além de mamarem, ingerem alimentos sólidos.

No Centro de Estudos de Criação de Animais de Laboratório (Cecal), estamos experimentando um manejo diferente do que tem sido recomendado para *hamsters*. O desmame é realizado aos 16 dias e toda a ninhada é retirada, com ficha de registro, para uma gaiola de camundongo, onde o acesso à ração é mais fácil. Os animais recebem também, diariamente, uma papa feita de farelo da própria ração e água a partir dos 10 dias de idade, quando estão ainda com as mães, e continuam a recebê-la até os 21 dias de idade, quando são sexados e colocados em gaiolas apropriadas aos *hamsters*. Nessa época, pesam em torno de 25 g a 30 g. No Cecal, os acasalamentos são realizados ao desmame; com isso, temos evitado as brigas e o estresse dos animais.

O *hamster* é um animal muito precoce e há casos em que se reproduziram com apenas um mês de idade, mas, geralmente, a puberdade ocorre aos 28 dias de idade e a maturidade sexual, aos 42. Os animais costumam ser acasalados aos 2 meses, sendo o macho um pouco mais velho e pesado do que a fêmea, que costuma ser bastante agressiva e pode chegar a castrá-lo; eles pesam em torno de 100 g nessa fase.

Manejo das Colônias

Quando pretendemos a auto-suficiência na produção de animais, devemos construir nossa colônia, subdividindo-a em outras duas ou três menores. São elas:

- Colônia de Fundação ou Produtora de Matrizes ou Piloto.
- Colônia de Expansão.
- Colônia de Produção.

Em se tratando de *hamsters*, praticamente todos os compêndios nos ensinam que devemos formar acasalamentos em que as fêmeas são levadas ao macho e, uma vez cobertas, retiradas para suas gaiolas isoladas. Os machos, conseqüentemente, são usados para cobrir um número de fêmeas que pode variar de 2 a 12. Nos animais *outbred*, esse tipo de esquema não altera o perfil genético da colônia, desde que os registros sejam precisos e que todas as fêmeas cobertas por um macho pertençam ao mesmo grupo. No Cecal, depois de várias tentativas,

conseguimos estabelecer acasalamentos monogâmicos permanentes, nos quais os animais são acasalados após o desmame, seguindo-se um método rotacional, e o macho nunca é retirado da gaiola da fêmea. Temos conseguido, com isso, aumentar a produtividade das fêmeas, como também tornar os animais mais dóceis.

Bibliografia

Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1986.

Van Hoosier Jr., G. & McPherson, C. (Eds.). *The Laboratory Hamster*. New York: Academic Press, 1987.

Principais Doenças dos Camundongos, Ratos e *Hamsters*

Andréa Mendes Pereira

Introdução

O progresso na ciência biomédica conduz, inevitavelmente, a uma grande sofisticação da metodologia científica. Nos últimos anos, tem sido perceptível o aumento da necessidade de refinamento na qualidade dos animais de laboratório, principalmente dos camundongos e ratos. A comunidade científica reconhece, cada vez mais, que as doenças nessas espécies alteram enormemente os resultados experimentais. Além disso, devemos considerar a grande variedade genética determinada pelas inúmeras linhagens existentes, o que estabelece extremos de susceptibilidade entre tais linhagens quando expostas aos mesmos agentes, sob as mesmas condições ambientais. Desse modo, prevenir e controlar a qualidade da saúde dessas colônias tem sido uma das tarefas mais exploradas pela ciência de animais de laboratório.

O *hamster*, geralmente considerado como uma das espécies mais sadias e resistentes, é um portador de diversos vírus e bactérias patogênicas para outras espécies de animais de laboratório e domésticas. Sendo assim, o controle sanitário dessa espécie é indispensável, não só pela interferência biológica, como também por ser fonte de infecção para outros animais, sobretudo quando partilham o mesmo ambiente.

O programa de prevenção e controle sanitário deve considerar três aspectos altamente interligados:

- a prevenção das condições que favorecem o estabelecimento das doenças através de manejo adequado dos animais na criação e experimentação, desfavorecendo o estresse; manutenção de barreiras sanitárias eficientes; higienização adequada do ambiente, equipamentos e materiais;
- a detecção de infecções latentes por meio de uma avaliação sistemática do estado sanitário da colônia, esgotando os meios de diagnóstico laboratorial desenvolvidos até o momento;
- o manejo da enfermidade nos casos de eventuais suspeitas de surtos, incluindo a identificação da doença, inibição de sua propagação e eliminação do agente causal.

Sistema Respiratório

As doenças do trato respiratório estão entre os problemas de saúde mais comuns no camundongo, rato e *hamster*. As condições envolvidas variam desde infecções inaparentes até aquelas causadas por agentes específicos, cujas patogenicidade e interferência na experimentação são variáveis. As formas subclínicas da doença são mais comuns, e o sinergismo de infecções concomitantes tem um efeito muito mais potente do que o realmente reconhecido.

Os agentes geralmente envolvidos nas doenças respiratórias estão listados a seguir, em ordem decrescente de importância.

Quadro 1 – Principais agentes patogênicos que acometem o trato respiratório de camundongos e ratos, agrupados em ordem decrescente de importância

GRUPO	CAMUNDONGO	RATO
I	Vírus Sendai *Mycoplasma pulmonis*	*Mycoplasma pulmonis* Vírus Sendai Bacilo cílio associado *Streptococcus pneumoniae* *Corynebacterium kutscheri*
II	Vírus da pneumonia do camundongo *Pneumocystis carinii* *Mycobacterium avium-intracellulare* *Chlamydia trachomatis* *Streptococcus pyogenes* *Mycoplasma neurolyticum* *Mycoplasma collis* *Vírus K*	Coronavírus do rato Vírus da sialodacrioadenite Vírus da pneumonia do camundongo *Pneumocystis carinii* *Klebsiella pneumoniae* *Mycoplasma collis*
III	*Corynebacterium kutscheri* *Chlamydia psittaci* *Pasteurella pneumotropica* *Bordetella bronchiseptica* Adenovírus	*Pasteurella pneumotropica* *Bordetella bronchiseptica* Adenovírus

Infecções por vírus Sendai associadas ao *Mycoplasma pulmonis* são bastante comuns tanto em camundongos quanto em ratos. No grupo II, estão incluídos agentes de pouca freqüência e importância questionável para esse sistema. No grupo III, estão patógenos que não são primariamente respiratórios.

No *hamster*, as infecções respiratórias são geralmente causadas por bactérias dos gêneros *Pasteurella*, *Streptococcus* e *Salmonella*. Muitos desses agentes podem ser habitantes naturais do trato respiratório nessa espécie animal. A doença clínica pode ser manifestada por pneumonia, conjuntivite, otite média e interna e encefalite.

Vírus Sendai

É um *Paramyxovirus* classificado como vírus da parainfluenza tipo I, sendo antigenicamente relacionado a outros vírus parainfluenza. Possui envelope, o que o torna sensível aos solventes orgânicos (éter, clorofórmio). O vírus já foi isolado em camundongo, rato e *hamster*. Na cobaia, já foi detectada evidência sorológica, mas o vírus ainda não foi isolado.

A transmissão se dá por contato direto e por aerossóis. A via de infecção é a nasal e o período de incubação é de 9 a 14 dias. Quando a colônia é infectada pela primeira vez, a doença se propaga por toda a população de animais, determinando estertores e dispnéia, gestação prolongada, morte neonatal, pós-desmame e menor ganho de peso dos animais em crescimento. Depois de instituída a imunidade, em dois meses, a colônia volta ao normal. Reinfecções posteriores passam a ser mantidas pela contínua oferta de animais jovens susceptíveis. No rato, quando a infecção não está associada a outros agentes, não traz maiores transtornos além de baixa fertilidade, redução de peso da prole e da taxa de crescimento.

A infecção é geralmente assintomática e com baixa mortalidade. Os animais mais susceptíveis, como o camundongo 129/J (atímico), *Swiss nude*, DBA/1J e DBA/2J, podem apresentar sinais de doença respiratória ou morte súbita. À necropsia, os pulmões estão consolidados com aspecto avermelhado e bordos demarcados entre as áreas sadias e afetadas. Microscopicamente, observa-se pneumonia intersticial, freqüentemente complicada por infecções bacterianas secundárias.

O diagnóstico é confirmado através da sorologia ou do isolamento do vírus em ovo embrionado de pinto ou em culturas de células renais de macaco, onde se observa o efeito citopático, ou se confirmam reações sorológicas 7 a 14 dias depois da inoculação com material coletado por *swab* nasofaríngeo ou de tecido pulmonar.

Como não se conhece a forma de transmissão do vírus, não existem meios específicos para evitar a propagação do mesmo. Prevenir a entrada do vírus na colônia é a medida mais segura. A derivação cesariana previne e elimina infecções virais e a transferência de embriões de fêmeas infectadas não contamina a mãe receptora.

A infecção pelo vírus Sendai em camundongos altera os parâmetros fisiológicos. No rato, interfere na mitogênese de células T e afeta estudos de carcinogênese.

Mycoplasma pulmonis

Mycoplasma pulmonis é o principal agente causador de infecções respiratórias crônicas no rato. Entretanto, outros agentes bacterianos e virais podem estar envolvidos simultaneamente. O agente também causa doença respiratória em camundongos, coelhos, cobaias e *hamsters*.

A infecção subclínica ocorre em animais mantidos sob barreiras e obtidos por derivação cesariana. A transmissão se dá por aerossóis e através da placenta. A doença pode se apresentar com sinais isolados ou combinados, que podem estar descritos como entidades separadas:

- otite média/interna que induz a um comportamento de andar em círculo;
- rinite com espirros e descarga nasal mucosanguinolenta;
- pneumonia com dispnéia e debilidade progressiva.

Mycoplasma pulmonis também pode infectar o trato genital das fêmeas, sendo capaz de determinar baixa fertilidade, redução de peso da prole ou até infertilidade completa, quando esta forma está presente na colônia.

O diagnóstico é confirmado após a cultura e o isolamento do agente a partir de amostras de *swabs* nasofaríngeos ou lavados traqueobrônquicos. Outros métodos de diagnóstico devem ser utilizados para excluir ou incriminar outros agentes.

A derivação cesariana e o programa de barreiras podem reduzir a prevalência da doença, mas não reduzem a prevalência da infecção. Dessa forma, somente a seleção de animais livres de micoplasmas, identificados por monitoramento contínuo, pode permitir a obtenção de estoques negativos.

Sistema Digestivo

A enfermidade de maior significado no *hamster* é uma doença entérica conhecida como ileíte proliferativa, enterite do *hamster* ou hiperplasia ileal atípica, caracterizada por diarréia fétida e aquosa (*wet tail*) e altas taxas de mortalidade entre os lactentes. O animal apresenta-se letárgico, irritado, anorético, com perda de peso e, finalmente, morre 48 horas após o estabelecimento dos sintomas.

A causa dessa condição ainda não é completamente esclarecida. Na literatura, os casos de surtos em colônias de *hamsters* relatam o isolamento de diferentes espécies de bactérias. *Escherichia coli* é a mais incriminada na enterite, ao passo que um organismo intracelular *Corynebacterium-like* parece estar envolvido nas lesões hiperplásicas. Vírus e protozoários também foram encontrados em *hamsters* com ileíte proliferativa, entretanto não foi comprovada sua relação com a doença. Essa condição é favorecida pelo estresse do confinamento.

O diagnóstico é baseado nos sintomas e nos achados histopatológicos. As lesões proliferativas no íleo são consideradas patognomônicas para essa doença. A antibioticoterapia é o único tratamento disponível, mas nem sempre é efetiva. A prevenção está envolvida com adequada higienização do ambiente, redução do estresse e adoção de quarentena para animais recém-adquiridos. A utilização de *top filters* mostrou-se eficaz contra a transmissão de uma gaiola para outra.

As doenças do sistema digestivo são comuns tanto no camundongo quanto no rato, tendo importância comparável às doenças respiratórias. Entretanto, os agentes patogênicos determinam efeitos mais sérios em neonatos e lactentes. Os sinais clínicos podem não estar evidentes quando o animal é enviado à experimentação ou, ainda, quando a diarréia e o retardo no crescimento são sinais muitas vezes difíceis de serem visualizados nessas espécies.

As infecções naturais do trato digestivo são geralmente resultantes da combinação de diversos agentes, sendo complicado determinar qual deles é o responsável pelos sintomas. Sendo assim, é indispensável a utilização de métodos complementares de diagnóstico, como a histopatologia do aparelho digestivo, inclusive das glândulas anexas.

A seguir, estão listados os agentes infecciosos em ordem decrescente de importância para infecções digestivas no camundongo e no rato.

Quadro 2 – Principais agentes patogênicos que acometem o trato digestivo de camundongos e ratos

GRUPO	CAMUNDONGO	RATO
I	Vírus da hepatite do camundongo *Spironucleus muris* *Bacillus piliformis* *Salmonella enteriditis* *Citrobacter freundii* *Giardia muris* Rotavírus de camundongo	Vírus da sialodacrioadenite *Spironucleus muris* *Bacillus piliformis* *Giardia muris*
II	Reovírus 3 *Pseudomonas aeruginosa* *Vampirolepys nana* *Syphacia* spp Citomegalovírus do camundongo	*Salmonella enteriditis* Rotavírus-like do rato *Pseudomonas aeruginosa* *Syphacia* spp
III	Vírus tímico do camundongo Adenovírus *Aspiculuris tetraptera* *Entamoeba muris* *Tritrichomonas muris*	Citomegalovírus do rato Reovírus-3 Adenovírus *Entamoeba muris* *Tritrichomonas muris*

No grupo I, estão incluídos os agentes de maior importância, mas devido à alta prevalência e os efeitos sobre a experimentação, serão discutidos mais detalhadamente o vírus da hepatite do camundongo, o vírus da sialodacrioadenite do rato e *Spironucleus muris.* No grupo II, estão reunidos os agentes de pouco significado, e no grupo III, estão aqueles de significado duvidoso.

Vírus da Hepatite do Camundongo

Trata-se de um coronavírus, sensível ao éter e ao clorofórmio e muito contagioso. É antigenicamente relacionado ao vírus da sialodacrioadenite, além de outros coronavírus.

O camundongo é considerado o hospedeiro natural. A susceptibilidade varia com a idade, a linhagem, o sexo e a virulência da cepa viral. A diferença de susceptibilidade genética se confirma entre as culturas de tecidos originados de linhagens resistentes e sensíveis (NZB, PRI, C3H, A e VSBS). Comumente, as fêmeas são mais afetadas do que os machos. Esse vírus pode interferir em estudos imunológicos tanto em linhagens sensíveis quanto em resistentes.

A infecção determina títulos baixos de anticorpos, o que explica o desenvolvimento de infecções inaparentes, mas que podem ser ativadas sob certas condições. Os adultos possuem imunidade adquirida na primoinfecção. Os neonatos estão protegidos pela imunidade passiva adquirida pelo colostro. A infecção se perpetua entre os animais recém-desmamados, com pouca ou nenhuma sintomatologia clínica, exceto quando estão imunologicamente comprometidos.

Podem servir como fontes de infecção os materiais inoculados contaminados com o vírus, as fezes (mais provável) e os aerossóis. As vias de penetração são a oral e a respiratória. Aparentemente não há infecção placentária.

Nas linhagens susceptíveis e em animais expostos ao vírus sem prévia aquisição de imunidade, a sintomatologia começa entre 4 a 7 dias após a infecção. A urina se torna amarronzada e mancha a região perineal, há icterícia e sinais neurológicos como espasmos, incoordenação, tremores e morte.

Os achados de necropsia são geralmente escassos, podendo incluir manchas pálidas isoladas ou congruentes no fígado e esplenomegalia. Microscopicamente, há necrose no fígado, no cérebro e em alguns órgãos linfóides. Ocorre também degeneração neuronal, encefalite não supurada e desmielinização. Um achado patognomônico é o de células multinucleadas que formam massas sinciciais a partir das células endoteliais de todos os órgãos após 24 horas de infecção.

O diagnóstico é confirmado pela sintomatologia, pela visualização das lesões típicas, no exame *post mortem* e pelo isolamento do vírus em cultivos primários de camundongo. O Elisa (Enzime-Linked Immunosorbent Assay) é o teste de escolha para monitoramento sorológico rotineiro. O fígado de camundongos atímicos expostos a animais suspeitos é o órgão de eleição para isolamento do vírus.

A derivação cesariana é o método mais prático para eliminar o vírus de uma colônia de camundongos, mas somente animais soronegativos devem servir como progenitoras. Barreiras sanitárias eficientes asseguram a manutenção de colônias livres da infecção. O monitoramento sorológico contínuo de subpopulações, a quarentena de animais adquiridos e o uso de filtros nas caixas de transporte são medidas indispensáveis na prevenção dessa enfermidade.

Vírus da Sialodacrioadenite

É um coronavírus altamente contagioso, determinante de inflamação das glândulas salivares e lacrimais. Os sintomas são fotofobia, lesões oculares, edema do globo ocular e aumento do lacrimejamento, que geralmente cedem em 1 ou 2 semanas. Quando a glândula salivar está afetada, ocorre edema na região cervical. Apesar da alta morbidade, em alguns casos a doença não determina altas taxas de mortalidade.

O rato é considerado o hospedeiro natural. A doença é propagada por contato direto e por aerossóis. Não há estado de portador: o vírus permanece no animal infectado apenas por sete dias. Os tecidos afetados são glândulas salivares, glândulas lacrimais, linfonodos cervicais, timo e mucosa do trato respiratório. Os animais adultos tornam-se imunes após a primoinfecção.

Nos lactentes com uma semana ou menos de idade pode haver uma conjuntivite transiente com fotofobia e exudato ocular com aderência dos bordos palpebrais, mas esses sintomas podem já ter desaparecido quando o animal é desmamado e fornecido ao pesquisador. Surtos repentinos e de alta prevalência podem ocorrer em colônias isentas de imunidade, afetando animais adultos e jovens. Nesses casos, os sintomas são mais severos como edema cervical, espirros, descarga nasal e ocular e úlcera de córnea.

A histopatologia das glândulas salivares e lacrimais revela necrose difusa do epitélio alveolar, acompanhada de infiltrado mononuclear e edema intersticial. No globo ocular, observam-se ceratite, úlcera de córnea, sinéquia, hifema e conjuntivite. Como seqüela da infecção, pode haver degeneração lenticular e retinal. No timo e nos linfonodos cervicais, são vistos focos de necrose.

O diagnóstico é presuntivo e baseado em achados histopatológicos das glândulas salivares e lacrimais. Muitas vezes, as lesões são encontradas uni ou bilateralmente em animais soronegativos. O vírus pode ser isolado em cultivos primários de células de rim de rato ou por inoculação intracerebral em camundongos neonatos e ser demonstrado por imunofluorescência sete dias após a inoculação.

Visto que não ocorre o estado de portador e não há infecções latentes, o vírus da sialodacrioadenite pode ser eliminado através da quarentena da sala afetada, com suspensão de acasalamentos e sacrifício dos recém-nascidos durante 6 a 8 semanas. Reinfecções devem ser controladas por meio de quarentena dos animais adquiridos.

A doença tem alto significado nas pesquisas que envolvem o globo ocular, glândulas salivares e lacrimais ou o trato respiratório de ratos. Pode exacerbar as infecções por *Mycoplasma pulmonis* e reduzir a *performance* reprodutiva, o ganho de peso e o consumo de ração.

Spironucleus muris

É um parasita intestinal comumente encontrado entre os roedores de laboratório, mesmo que mantidos sob barreiras sanitárias eficientes; sua importância está relacionada às alterações que causa na resposta imunológica. Trata-se de um protozoário flagelado, com ciclo vital direto, que afeta camundongos, ratos e *hamsters*.

Os animais jovens são os mais susceptíveis e se infectam devido à ingestão de cistos altamente resistentes às condições ambientais (são inativados por alguns desinfetantes e altas temperaturas = 45 ºC por 30 min). Nos animais adultos, estão presentes poucos trofozoítas, encontrados apenas nas glândulas do piloro.

A infecção é geralmente subclínica em animais imunocompetentes. Enterites crônicas graves são relatadas em camundongos atímicos ou irradiados. Os sintomas são diarréia, desidratação, pelagem áspera, perda de peso, apatia, postura arqueada, distensão abdominal e mortalidade esporádica.

Nos animais imunocompetentes, geralmente não há resposta inflamatória, porém os animais altamente parasitados desenvolvem enterites moderadas a severas, caracterizadas por hiperemia do intestino delgado, contendo fluido aquoso e gás. Esse conteúdo intestinal serve para demonstração do parasita. A histopatologia do órgão revela distensão das criptas intestinais por aglomerados de trofozoítas presentes no espaço intervilosidades. Há encurtamento das microvilosidades e aumento do *turnover* dos enterócitos.

O diagnóstico é confirmado pela demonstração do parasita no conteúdo intestinal. Casos de infecções mais brandas podem ser confirmados pela histopatologia de seções intestinais e do piloro.

Os procedimentos recomendados para o controle do *S. muris* são a derivação cesariana e a manutenção de barreiras sanitárias eficientes.

Sistema Tegumentar

As doenças que afetam a pele e os anexos cutâneos contribuem para muitas das anormalidades clínicas observadas no camundongo e no rato. O diagnóstico definitivo de enfermidades do sistema tegumentar é freqüentemente difícil, mesmo que sejam utilizados métodos laboratoriais apropriados, devido às complexas interações entre os seguintes fatores: agentes patogênicos, agentes oportunistas, resposta e variação genética do hospedeiro, fatores ambientais, interações sociais e outros desconhecidos.

As dermatites/alopécias são as enfermidades freqüentemente observadas. Os ectoparasitas e *Staphylococcus aureus* (um comensal da pele) lideram as causas de doenças de pele no camundongo, enquanto, no rato, este último agente infeccioso é o mais importante. O *hamster* é também afetado por ectoparasitos, fungos dermatófitos e *S. aureus*.

Ectoparasitos

Os ectoparasitos têm maior importância em colônias convencionais e são favorecidos pelo estresse da experimentação. Causam efeito mais evidente sobre o tegumento e o estado geral do animal, principalmente quando o agente é hematófago, podendo depreciar a qualidade do animal para a experimentação. Os agentes mordedores alteram a integridade do tegumento, confundindo os resultados da pesquisa.

Entre os parasitas mais comuns no camundongo e no rato estão três ácaros: *Myobia musculi*, *Myocoptes musculinus* e *Radfordia affinis*. *Demodex criceti* e *Demodex aurati* são encontrados no *hamster*, mas não são considerados patogênicos em condições naturais.

Myobia musculi, *Myocoptes musculinus* e *Radfordia affinis*

Myobia musculis é considerado o ácaro mais patogênico no camundongo, enquanto *Myocoptes musculinus* determina lesões mais brandas e *Radfordia affinis* não é reconhecido como um patógeno significante.

O ciclo vital desses ácaros se completa entre 14 e 23 dias. A transmissão é por contato direto, ou por equipamentos/materiais e correntes de ar (aderido aos pêlos). As infestações são comumente subclínicas. Quando presentes, os sintomas são prurido, alopécia, traumatismo, ulceração da pele e pioderma. As regiões mais afetadas são o dorso, a cabeça e os ombros. As lesões são caracterizadas por hiperqueratose, inflamação e infecção bacteriana secundária.

O diagnóstico é feito através da demonstração e identificação dos ácaros na pele e na base dos pêlos, com o auxílio de um microscópio estereoscópio ou uma lupa.

O controle mais efetivo é a derivação cesariana e a manutenção de barreiras sanitárias. A aplicação de substâncias acaricidas controla a infestação, mas não a erradica completamente, além de interferir na experimentação.

Staphylococcus aureus

O microorganismo comumente isolado das lesões de pele de ocorrência natural, no camundongo, no rato e no *hamster*, é *Staphylococcus aureus*. Trata-se de uma das bactérias não esporuladas mais resistentes e está presente na nasofaringe, trato digestivo posterior e no ambiente. O homem pode servir de fonte de infecção para o animal e vice-versa.

A doença clínica depende da virulência da bactéria, das injúrias traumáticas, do hospedeiro e das condições de sanitização do ambiente. As formas clínicas podem ser descritas como dermatites ulcerativas, abscessos e pododermatites.

O diagnóstico depende do isolamento e da identificação do agente a partir do material contido nas lesões, excluindo outros possíveis agentes.

O controle é obtido através de melhoria na sanitização, esterilização de gaiolas e equipamentos e da eliminação de equipamentos que possam causar traumatismos.

Sistema Hematopoiético

Vírus da Coriomeningite Linfocítica (LCMV)

Embora o vírus da coriomeningite linfocítica tenha sido considerado um patógeno tradicionalmente do sistema nervoso central, a viremia e as respostas imunológicas do hospedeiro têm participação central na patogenia, o que justifica seu reconhecimento como um patógeno do sistema hematopoiético.

Trata-se de um *arenavírus*, com envelope (sensível ao éter e formaldeído), tendo, ainda, grande significado zoonótico para pessoas que trabalham com material biológico extraído de camundongos e para proprietários de *hamsters* de estimação. A forma latente da doença interfere em trabalhos experimentais com outros vírus neurotrópicos.

O camundongo selvagem é o reservatório principal da doença, mas o camundongo de laboratório e o *hamster* sírio são considerados hospedeiros naturais. São susceptíveis o homem, os primatas, os cães, os coelhos, as cobaias, os ratos e as galinhas. O LCMV também utiliza diversas linhagens de tumores transplantáveis como hospedeiras em laboratório. Apenas os camundongos e os *hamsters* são reconhecidamente transmissores da doença, podendo eliminar altas concentrações do vírus na urina, na saliva e no leite.

A via de infecção é, provavelmente, através de membrana mucosa e de solução de continuidade da pele. A transmissão se dá por contato direto ou por via placentária.

A doença pode ocorrer de duas formas:

Infecção tolerante persistente – resultante de infecção adquirida no útero ou com alguns dias de idade. Há uma viremia seguida de eliminação do vírus por toda a vida e, posteriormente, o animal desenvolve um quadro de glomerulonefrite com conseqüente emaciação, postura arqueada, ascite e morte;

Infecção não tolerante (aguda) – resultante de infecções adquiridas após uma semana de idade. Há uma viremia sem eliminação do vírus. O curso pode ser fatal dentro de alguns dias ou semanas, ou haverá uma recuperação com eliminação do vírus.

Apesar de estar amplamente distribuída, a enfermidade clínica é rara e depende do vírus, da linhagem do hospedeiro, via de inoculação e idade. Quando inoculado por via intracerebral, o vírus causa convulsões e morte, porém quando inoculado por via intravenosa, produz baixa incidência da doença com pelagem áspera e letargia. As cepas viscerotrópicas causam incidência e mortalidade mais baixas do que as neurotrópicas.

As lesões anatomopatológicas do LCMV são congestão, infiltração linfocítica das meninges, peritonite e proliferação do sistema monocítico fagocitário. Como o vírus se replica primariamente nas células de Kupfer, a necrose hepática é concomitante à doença clínica.

O diagnóstico é realizado por meio da sorologia (imunofluorescência, Elisa) e da inoculação de animais com amostras do fígado de animais suspeitos. Por se tratar de enfermidade transmitida verticalmente, tanto pelas células germinais quanto pela placenta, a derivação cesariana deve partir de progenitoras livres da infecção.

Depois da obtenção de colônias livres do agente, barreiras sanitárias eficientes previnem a entrada do vírus.

A forma latente da doença interfere em trabalhos experimentais com outros vírus neurotrópicos. O LCMV é um contaminante comum de diferentes tipos celulares, desde células tumorais, células de mamíferos, estoques de vírus e de protozoários. Interfere positivamente na indução de tumores por vírus e na ativação precoce de células *natural killers*. Além disso, deprime a imunidade humoral e celular e retarda as reações de rejeição de transplantes.

Vírus da Desidrogenase Láctica

O vírus da desidrogenase láctica é de grande significado na pesquisa, envolvendo tumores transplantáveis, oncologia viral e imunologia. Além disso, diminui a concentração plasmática de desidrogenase láctica. É específico de camundongos; tem tropismo por macrófagos.

É classificado como um togavírus, geralmente transmitido experimentalmente por uma variedade de vias. Sua eliminação por meio da urina, das fezes e da saliva diminui drasticamente logo após a infecção, que determina uma viremia persistente. A via transplacentária é possível se a mãe for infectada durante a gestação. A infecção determina uma viremia persistente. A doença é assintomática. A suspeita da presença do vírus é baseada em alterações dos resultados da pesquisa. Na necropsia, o animal apresenta esplenomegalia e linfadenomegalia. Microscopicamente, há hiperplasia da polpa branca e vermelha no baço e hiperplasia medular nos linfonodos.

O diagnóstico é confirmado com a inoculação de material suspeito em diversas diluições em camundongos e, após quatro dias, a desidrogenase láctica plasmática é dosada. A concentração normal da enzima é de até 500 unidades por ml de plasma.

A derivação cesariana de fêmeas isentas de infecção ou infectadas cronicamente elimina o vírus das colônias, desde de que estas sejam mantidas sob barreiras sanitárias. A passagem de inóculo em outros roedores não susceptíveis elimina o vírus.

Haemobartonella muris e *Eperythrozoon coccoides*

São parasitas sangüíneos com maior significado em trabalhos experimentais envolvendo passagem de material de rato para rato (*H. muris)* e de camundongo para camundongo (*E. coccoides*). Os agentes são classificados como riquétsias, obrigatoriamente intracelulares, que parasitam hemácias. São transmitidos por um piolho, *Polyplax spinulosa,* ou pela inoculação de materiais biológicos.

A infecção se mantém assintomática por toda a vida do animal, a menos que seja ativada por uma imunossupressão natural ou experimental. Os sintomas incluem anemia, dispnéia, perda de peso e hemoglobinúria. Nas infecções naturais, não há lesões visíveis, e a parasitemia não é detectada em esfregaços sangüíneos. Na doença ativa, são observadas a anemia, esplenomegalia, hemoglobinúria e parasitemia. Esses parasitas reduzem a vida média das hemácias, atrapalham o curso experimental da malária, aumentam a atividade fagocitária e a rejeição de transplantes.

O diagnóstico consiste em ativar a infecção através de esplenectomia e diagnóstico da infecção em cada indivíduo. Os mais velhos são mais susceptíveis a desenvolver a doença severa. O controle da infecção é baseado na prevenção do vetor, na derivação cesariana e na manutenção de barreiras sanitárias.

Vírus da Leucemia Murina

O grande grupo de vírus geneticamente relacionados, conhecidos como vírus da leucemia murina, compreendem viroses endógenas encontradas em todas as células hospedeiras do camundongo. Causam neoplasias hematopoiéticas sob condições apropriadas e são muito utilizados como modelo experimental para estudos de biologia molecular, virologia, genética, patologia e quimioterapia experimental de leucemias. São classificados como oncovírus tipo C da família Retroviridae; têm como hospedeiros naturais o camundongo selvagem e de laboratório. Ocorre transmissão vertical através dos gametas e horizontal através da saliva, da urina, das fezes, do leite ou da placenta.

Existem duas fases distintas no ciclo vital do vírus. Em uma delas, o genoma viral (DNA), ou provírus, que está integrado ao genoma da célula hospedeira, é replicado e transmitido às células filhas. Na segunda fase, o RNA complementar do vírus é sintetizado e armazenado em partículas virais que infectarão novas

células hospedeiras. Na célula hospedeira, o vírus usa a transcriptase reversa e transcreve o RNA viral em DNA para que seja integrado ao genoma da célula.

Mesmo os animais *germfree* contêm provírus integrados ao seu genoma. A infecção horizontal é pouco significativa. Resta apenas o controle de animais inoculados com altas doses do vírus, que devem ser isolados do grupo controle não-infectado.

A malignidade das infecções naturais decorrentes do vírus da leucemia murina é rara. As leucemias se apresentam predominantemente na forma de linfomas.

O diagnóstico é baseado nas lesões histopatológicas encontradas nas neoplasias hematopoiéticas. O isolamento e a identificação requerem técnicas especializadas de oncologia.

Sistema Nervoso Central

Apenas dois agentes são considerados patógenos primários do sistema nervoso central. O vírus da encefalomielite de Theiler raramente causa doença clínica em camundongos. *Encephalitozoon cuniculi*, um patógeno comum de coelhos, tem sido descrito no camundongo, no rato e no *hamster*, mas não foi observada doença clínica nessas espécies. Ambos os agentes têm sido encontrados como contaminantes de cultura de roedores.

Vírus da Encefalomielite de Theiler

Este enterovírus causa, no camundongo e no rato de laboratório, uma doença semelhante à encefalomielite infantil humana.

O agente está presente em baixas concentrações em animais infectados, geralmente com quadro clínico inaparente. O vírus é encontrado no conteúdo e na mucosa intestinal e linfonodos mesentéricos. A infecção ocorre entre a 3ª e a 6ª semana de idade e a transmissão se dá por via oral-fecal. Quando ocorre viremia, o vírus se propaga do intestino para a medula espinhal, determinando um quadro clínico caracterizado por paralisia flácida de um ou ambos os membros posteriores. A lesão típica da doença é a poliomielite não supurativa com necrose e neuronofagia.

O diagnóstico é sorológico, sendo mais definitivo a partir do isolamento do vírus, presente na medula espinhal e no cérebro de animais doentes, em células BHK-21. Também é possível o isolamento a partir do conteúdo intestinal em animais assintomáticos.

O controle é alcançado com a obtenção de animais livres da infecção, mantidos sob barreiras e monitorados sorologicamente.

Encephalitozoon cuniculi

Trata-se de um protozoário intracelular obrigatório, importante em estudos envolvendo passagem de material biológico de camundongo para camundongo. Tem como hospedeiros o coelho, o camundongo, o rato, o *hamster*, o cão, primatas não-humanos e outros mamíferos, sendo o coelho considerado a principal fonte de infecção.

O parasita é eliminado na urina e a infecção ocorre por via oral (transmissão horizontal). No coelho, ocorre também a transmissão vertical. Essas infecções são geralmente inaparentes e a lesão clássica é uma meningoencefalite granulomatosa multifocal, com o centro necrótico ocupado pelo parasita, que também pode estar presente no epitélio tubular renal.

O diagnóstico é sorológico e suficiente para selecionar animais livres da infecção e para controlar a doença em camundongos e ratos.

Sistema Geniturinário

Apenas três agentes causam infecções primárias no trato geniturinário de camundongos e ratos:

- *Leptospira interrogans ballum*, que causa infecção renal em camundongo;
- *Mycoplasma muris*, que já foi isolado do trato genital de ratas;
- *Mycoplasma pulmonis*, que é capaz de causar infecção genital severa (assim como a respiratória) em ratos Lewis, caracterizada por piometra, salpingite e perioforite.

Leptospira interrogans ballum

Este agente tem pouco significado como causador de infecções naturais, tendo baixa prevalência nas colônias atuais de camundongos. Vários casos clínicos de leptospirose já foram relatados em pessoas que trabalham com esses animais.

A transmissão do agente depende da contaminação e sobrevivência no meio ambiente. Os roedores silvestres, de modo geral, são considerados hospedeiros naturais do agente, sendo o camundongo o mais importante. O rato selvagem é o reservatório primário da *Leptospira interrogans icterohemorragiae*. Os *hamsters* podem ser inadvertidamente infectados quando inoculados com material biológico de camundongos inaparentemente infectados e, a partir daí, costumam desenvolver a doença num curso fatal de 4 a 6 dias.

A infecção apresenta duas fases: uma septicêmica e uma leptospirúrica; a eliminação pela urina ocorre na segunda fase. No camundongo, a doença é subclínica. Não há lesões aparentes e o agente pode ser revelado em cortes histológicos do tecido renal durante a fase leptospirúrica.

A sorologia é o meio de diagnóstico de eleição. A derivação cesariana e a manutenção de barreiras sanitárias eficientes favorecem o controle da doença.

Bibliografia

Hoosier, G. L. & McPherson, C. W. *Laboratory Hamsters*. Academic Press: London, 1987.

National Research Council. *Infectious Diseases of Mice and Rats*. National Academy Press: Washington, D.C., 1991.

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to Use and Care of Experimental Animals*. Canadian Council on Animal Care: Otawa, 1984.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). *Temas Seleccionados sobre Medicina de Animales de Laboratório: el raton.* Rio de Janeiro: CPFA/OPS/OMS, 1976. (Serie de Monografias Cientificas y Tecnicas)

18

Camundongos Mutantes mais Utilizados

Belmira Ferreira dos Santos

Beige (Lyst ^{bg})

É um gene recessivo autossômico, situado no cromossomo 13, e os camundongos são modelos para o estudo da Síndrome de Chediak-Higashi. O acasalamento se faz entre bg/bg x bg/bg (tanto o macho quanto a fêmea são homozigotos recessivos).

Lisossomos são vesículas localizadas no citoplasma da célula que têm a função de digerir organelas celulares envelhecidas e bactérias. No camundongo mutante *beige* e em portadores da Síndrome de Chediak-Higashi, vesículas gigantescas se originam nos lisossomos que se fundem uns aos outros e algumas enzimas se concentram em locais errôneos, dentro da célula. Descobriu-se um gene que codifica uma proteína que parece ser a responsável por esse transporte de lisossomos. O gene foi designado *lysosomal trafficking regulator*.

As anormalidades descritas nos camundongos são muito semelhantes às humanas e se acredita que os genes possuam homologia. A mutação original, no camundongo, deve ter sido induzida por radiação. Nos homozigotos, a cor dos olhos é mais clara no nascimento, as orelhas e a cauda apresentam pigmentação reduzida e o pêlo é mais claro do que a linhagem original. Eles têm uma severa deficiência de células *natural killer* (NK), defeitos de pigmentação e também lisossomos cujas funções estão alteradas. Outra característica é o baixo número de plaquetas apresentado, o que faz com que o tempo de sangramento nesses animais seja anormalmente longo. O pleno desenvolvimento dos alvéolos pulmonares é incompleto e eles se tornam muito grandes.

Camundongos *beige* imunodeficientes têm sido acasalados com mutantes Scid para o estudo de transplantes e doenças. O duplo mutante é altamente susceptível a infecções, mesmo aquelas produzidas por microorganismos geralmente não-patogênicos para camundongos; por isso, recomenda-se que eles sejam mantidos somente em condições SPF.

Nude (Hfh11 ^{nu})

É um gene recessivo autossômico, situado no cromossomo 11. O acasalamento se faz entre macho nu/nu x fêmea nu/+ (as fêmeas têm de ser heterozigotas, pois a ausência de pêlos impede que mantenham os filhotes aquecidos e a produção de leite é muito menor). Esse tipo de acasalamento produz 50% de heterozigotos e 50% de homozigotos recessivos. Os machos homozigotos e as fêmeas heterozigotas são aproveitadas para os próximos acasalamentos e os outros animais são descartados.

O Dr. Grist identificou um camundongo mutante sem pêlos no laboratório de vírus do Ruchill Hospital, em Glasgow, e enviou-o ao Instituto de Genética Animal para estudos.

Os camundongos homozigotos apresentam, além da falta de pêlos, um timo rudimentar ou a total ausência dele, o que faz com que os animais tenham deficiência na produção de linfócitos T. Em animais com timo rudimentar, não se nota a diferenciação das regiões cortical e medular. Em conseqüência da deficiência de linfócitos T, os animais não rejeitam transplantes de outras linhagens e sua susceptibilidade às infecções é muito alta. Os animais são menores, crescem mais lentamente, apresentam defeitos de ossificação, são menos férteis e morrem mais facilmente. Os folículos pilosos são normais, mas a excessiva queratinização da pele impede a sua erupção.

Camundongos *nude* são bastante usados, como animais timectomizados naturalmente para o estudo do timo nas respostas imune. Devido a sua pouca resistência às infecções, aconselha-se que esses animais sejam mantidos em condições SPF ou *germfree*.

Distrofia Muscular (Lama 2 ^{dy})

É um gene recessivo autossômico, situado no cromossomo 10. O acasalamento é feito entre machos e fêmeas heterozigotos: dy/+ x dy/+.

As lamininas são uma família de matrizes glicoprotéicas extracelulares, componentes de membranas basais. Elas têm outras atividades como ajudar na adesão, migração, proliferação e diferenciação celulares. As suas moléculas consistem em uma cadeia pesada (alfa) e duas leves (beta e gama).

A laminina alfa 2 também é conhecida como merosina. Uma laminina alfa 2 defeituosa foi encontrada nos músculos cardíaco e esquelético e nos nervos periféricos de camundongos mutantes.

Pacientes humanos com deficiência de merosina apresentam distrofia muscular congênita e são homozigotos para genes que causam uma cadeia alfa 2 truncada. No camundongo, não há a produção da cadeia alfa 2.

Essa mutação ocorreu no The Jackson Laboratory, espontaneamente, na linhagem 129/Re, em 1951. Os camundongos homozigotos são caracterizados por progressiva fraqueza e a paralisia começa por volta das 3 e ½ semanas de idade. Os músculos dos membros posteriores são os primeiros a ser afetados e depois vêm os do esqueleto axial e os dos membros anteriores. A morte ocorre aos 6 meses de idade e os animais são geralmente estéreis.

Hairless (HR)

É um gene recessivo autossômico, situado no cromossomo 14. O acasalamento é feito entre macho hr/hr x fêmea hr/+ (assim como as fêmeas *nude*, as fêmeas *hairless* não aquecem os filhotes e produzem pouco leite).

A mutação original foi identificada em um camundongo capturado em um aviário, em Londres. Animais homozigotos desenvolvem pelagem normal, mas o pêlo começa a cair aos 10 dias de idade, podendo voltar a crescer em pequenos tufos que logo caem. O animal permanece pelado por toda a vida, mas não apresenta deficiências imunológicas severas como as encontradas no camundongo *nude*. A sua baixa resposta imunológica se deve à deficiência de células *T helper*. As vibrissas crescem, caem e tornam a crescer, tornando-se anormais com a idade. As unhas crescem e se encurvam e, histologicamente, pode-se observar uma hiperqueratose do epitélio estratificado com desenvolvimento de cistos.

Diabetes (Lepr ^{db})

É um gene recessivo autossômico, situado no cromossomo 4. Há indícios de que esteja em *linkage* com o gene *misty*. O acasalamento se faz entre macho db/+ x fêmea db/+ (os machos e as fêmeas homozigotos são estéreis).

A leptina é um hormônio controlador do peso e foi descoberto que, no camundongo, o gene que a controla é uma variação da mutação obesidade. A diabetes no camundongo foi proposta como uma mutação no gene que codifica o receptor da leptina, daí a sua designação *leptin receptor*.

A mutação original apareceu espontaneamente na linhagem C57BLKS. Os camundongos homozigotos são distinguidos dos normais por volta das 3 a 4 semanas de idade, devido a sua obesidade em comparação com seus irmãos normais.

A elevação da insulina plasmática começa dos 10 aos 14 dias de idade e a elevação da glicose sangüínea por volta da 4ª semana. Os camundongos apresentam polifagia, polidipsia e poliúria. O curso da doença é influenciado pelo *background* genético, no qual o gene mutante se encontra. No *background* C57BLKS ocorre um grande aumento na taxa de glicose, severa destruição das células secretoras de insulina no pâncreas e morte aos 10 meses de idade. No *background* C57BL/6 existe uma hiperplasia compensatória nas células pancreáticas e uma contínua hiperinsulinemia até a morte do animal, por volta dos 20 meses de idade.

Obesidade (Lep ^{ob})

É um gene recessivo autossômico, situado no cromossomo 6. O acasalamento se dá pelo cruzamento de machos ob/+ x fêmeas ob/+ (as fêmeas homozigotas são estéreis e a maioria dos machos que não estão em dietas especiais também).

Os camundongos mutantes obesos não possuem a proteína leptina, encontrada predominantemente nos tecidos adiposos de animais normais. O gene codificador da leptina foi identificado no *locus* da obesidade, o que ocasionou a mudança do nome de ob para Lep.

Essa mutação ocorreu naturalmente, no The Jackson Laboratory, em algumas linhagens. Os mutantes podem ser identificados com 4 semanas de idade. Eles aumentam de peso rapidamente até atingir quase três vezes o peso normal. Também exibem hiperfagia, hiperglicemia semelhante ao diabetes, intolerância à glicose, elevados níveis de insulina plasmática, subfertilidade e aumento da produção hormonal das glândulas pituitária e adrenal. Apresentam, ainda, dificuldades em manter a temperatura corpórea em baixas temperaturas.

A obesidade é caracterizada pelo aumento do número de adipócitos e pelo aumento das células em si. Essa característica contrasta com outros camundongos obesos, nos quais a causa é somente o aumento dos adipócitos, mas não o seu número.

Scid (Prkdc ^{scid})

É um gene recessivo autossômico, situado no cromossomo 16. O acasalamento é realizado entre machos scid/scid x fêmeas scid/scid.

Proteíno-quinases ativadas por DNA funcionam reparando a cadeia dupla deste. O início do processo de recombinação necessita de quebras precisas na cadeia de DNA. O ligamento dessas partes que foram separadas seguindo o molde da recombinação é essencial para o processo. Os camundongos mutantes apresentam o processo de reparo defeituoso, fazendo com que os pedaços de DNA sejam ligados de forma errada. Apresentam,

ainda, o processo de reparo de DNA quebrado por radiação ionizante defeituosa. Existe evidência de que o defeito é devido a uma mutação no gene que codifica a subunidade catalítica da proteíno-quinase ativada por DNA.

A mutação se deu na linhagem CB-17. A maioria dos homozigotos não possuem imunoglobulinas dos tipos IgA, IgM ou IgG, mas alguns animais têm baixíssimos níveis de alguma ou das três. Os órgãos linfóides desses animais se apresentam com um décimo do seu tamanho normal. Timo, linfonodos e o baço estão completamente destituídos de linfócitos. Os animais homozigotos são totalmente deficientes de linfócitos T e B e suas células esplênicas não respondem a estímulos de mitose para células B ou T; por esta razão, não rejeitam transplantes. O defeito parece estar nas células precursoras do sistema linfóide, já que transplantes de medula óssea restauram a capacidade de produção de células B e T funcionais.

Embora a maioria dos homozigotos falhe em produzir imunoglobulinas e receptores para células T funcionais, alguns os produzem em baixos níveis e ocasionalmente um indivíduo pode apresentar níveis quase normais de imunoglobulinas séricas. Esse fenômeno é descrito como *leakness*.

Os homozigotos são férteis e em condições SPF ou *germfree* podem viver por até 1 ano ou mais. Esses animais têm sido usados extensivamente no estudo do sistema imune e nas transplantações, principalmente no estudo das metástases de tumores humanos.

Bibliografia

Foster, H.; Small, D. & Fox, G. (Eds.). *The Mouse in Biomedical Research*. New York: Academic Press, 1983.

Green, E. H. *The Biology of Laboratory Mouse*. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1966.

The Jackson Laboratory. *Handbook on Genetically Stardadized JAX Mice*. Bar Harbor: The Jackson Laboratory, 1997.

Criação e Manejo de Primatas Não-Humanos

Márcia Cristina Ribeiro Andrade

Introdução

Existem muitas controvérsias referentes à classificação dos primatas não-humanos. Atualmente, existem 128 espécies, sendo 51 pertencentes ao Novo Mundo (América) e 77 ao Velho Mundo (Ásia e África) (Figs. 1 e 2).

Os primatas do Velho Mundo pertencem à infra-ordem *Catarhini* (*kata* = inferior; *rhini* = nariz); distinguem-se basicamente do grupo americano pela posição das aberturas nasais, voltadas para baixo, e pela presença de um septo nasal delgado (Fig. 3). Possuem 32 dentes; unhas achatadas (nunca em garras); algumas espécies apresentam calosidades ciáticas, de colorido vivo; a cauda, quando presente, não é preênsil.

Os *Platyrrhini* (*platy* = largo, *rhini* = nariz) vivem exclusivamente no continente americano (Fig. 4). A sua origem e a história de sua migração para a América do Sul são ainda discutidas em virtude da escassez de fósseis. Admite-se que os primatas tiveram origem na América do Norte, há cerca de 60 milhões de anos, de onde migraram para o sul, para a Eurásia e África, evoluindo separadamente. Distinguem-se das espécies do Velho Mundo por terem o septo nasal largo, o polegar não completamente oponível, a ausência de calos ciáticos e de bolsas jugais, e a dentição, constituída por 32 ou 36 dentes, com 6 pré-molares superiores e 6 inferiores. No conjunto, são de porte menor. Um grupo de espécies possui a cauda preênsil. Exclusivamente arborícolas, não existem espécies adaptadas à vida terrícola. Em geral, habitam terrenos florestados e poucos descem ao solo em busca de água ou alimento, que encontram com abundância no alto das árvores.

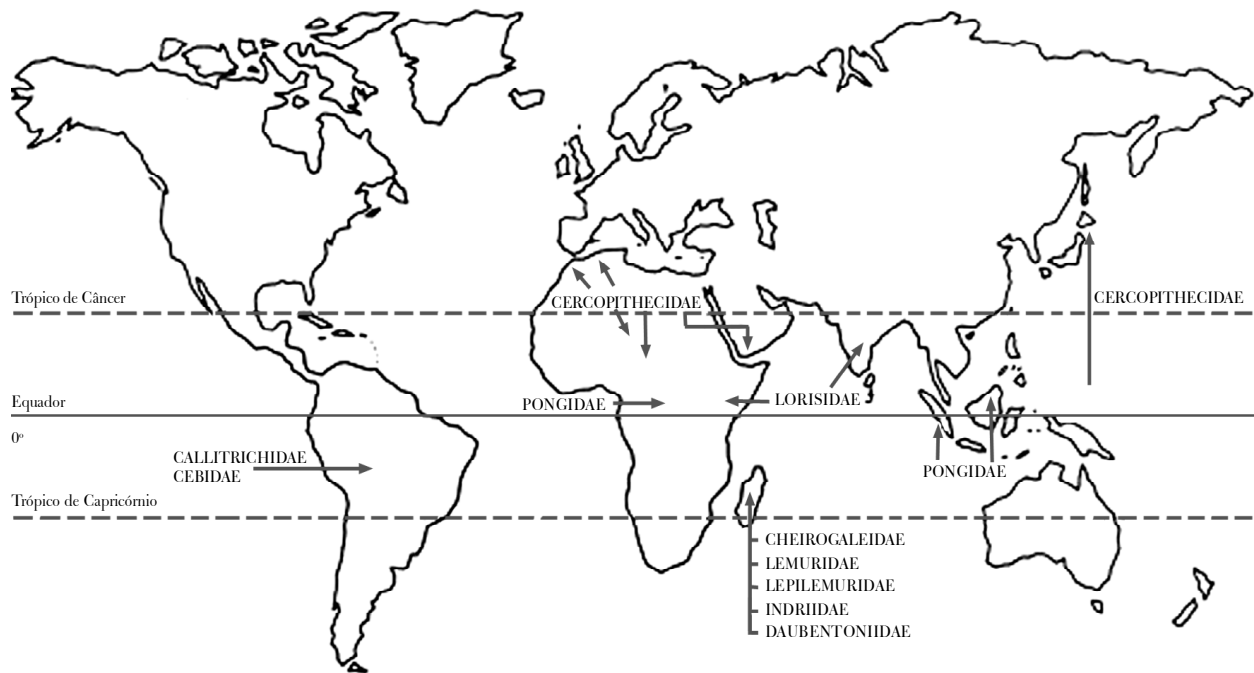
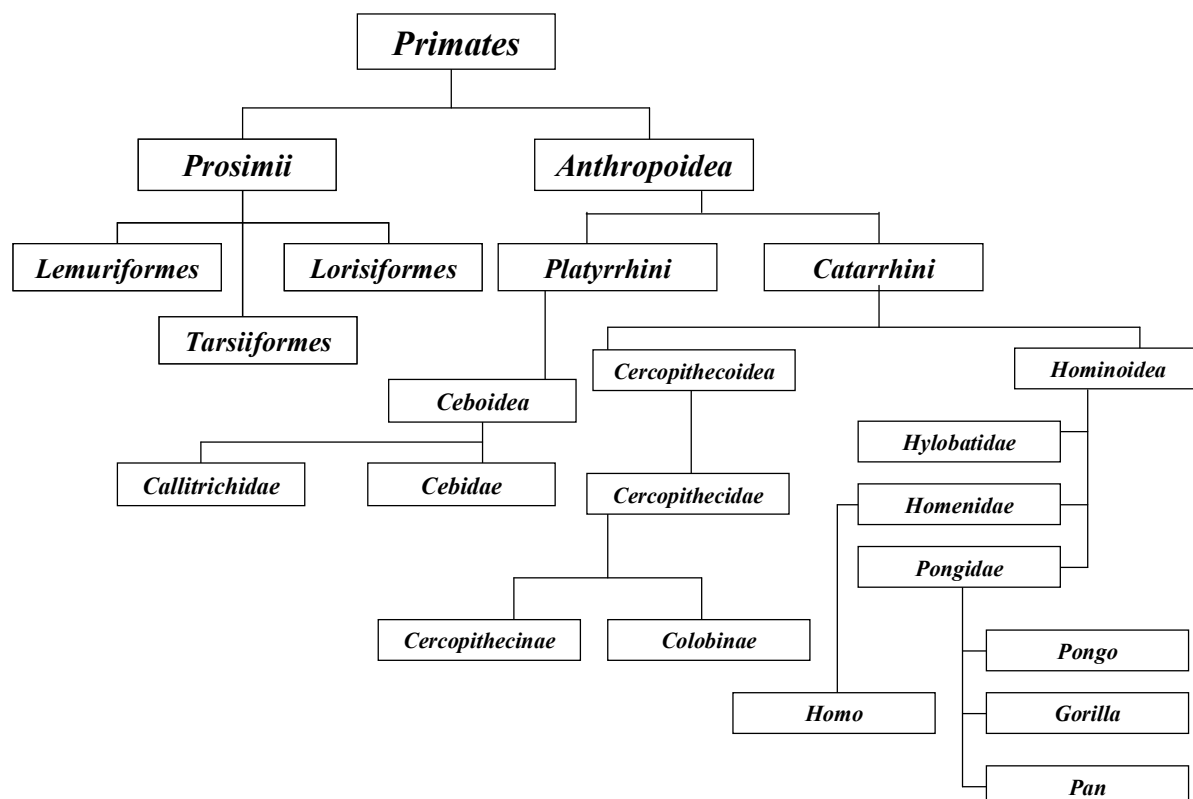
Figura 1 – Distribuição mundial dos primatas não-humanos

Fonte: Kavanagh (1984).

Figura 2 – Classificação dos primatas

Fonte: Kavanagh (1984).

Os primatas compartilham uma vida social extremamente complexa. A composição das unidades sociais é bastante variável, abrangendo desde espécies solitárias a sociedades com organizações de múltiplas famílias. Dessa forma, existem categorias distintas de criação animal com o intuito de respeitar tais peculiaridades.

Quando os primatas não-humanos começaram a ser utilizados como animais de laboratório, a partir dos anos 50, muitos fatores foram levados em consideração, visando à manutenção efetiva desses animais em cativeiro. O sucesso da pesquisa em primatas encontra-se diretamente relacionado à qualidade das técnicas de manejo empregadas, incluindo alojamentos apropriados para cada espécie envolvida, conhecimento dos aspectos fisiológicos, nutricionais e genéticos, assim como a realização de um controle sanitário constante por meio de exames clínicos e laboratoriais complementares de rotina.

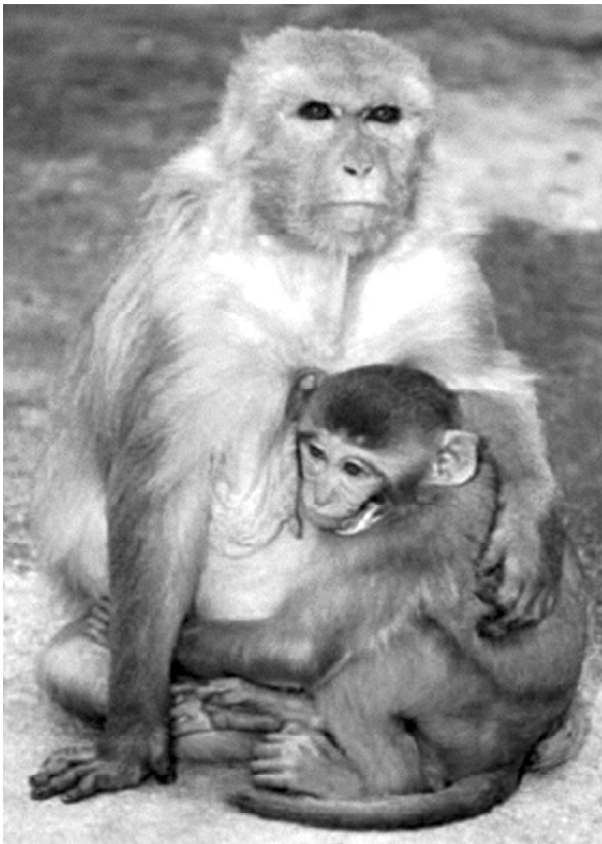
Figura 3 – Macaco rhesus (*Macaca mulatta*), primata do Velho Mundo pertencente à família Cercopithecidae

Fonte: Departamento de Primatologia do Centro de Criação de Animais de Laboratório / Fiocruz.

Figura 4 – Mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), primata do Novo Mundo

Fonte: Departamento de Primatologia do Centro de Criação de Animais de Laboratório / Fiocruz.

Nutrição

O *status* nutricional influencia diretamente no crescimento, na reprodução e na longevidade dos primatas, bem como na capacidade de resistência aos patógenos. A dieta adequada é essencial ao bem-estar animal e assegura resultados reprodutíveis nas pesquisas biomédicas.

A nutrição adequada dos primatas envolve aproximadamente 50 nutrientes essenciais. Além das exigências nutricionais a serem obedecidas, é importante saber que existem fatores capazes de interferir

na qualidade dos alimentos, tais como palatabilidade, transporte e estocagem do alimento, e concentração de contaminantes químicos e biológicos. A boa palatabilidade alimentar favorece a aceitação do alimento pelo animal.

Assim como nas outras espécies de mamíferos, os requerimentos nutricionais dos primatas variam de acordo com estágios do ciclo de vida, como crescimento, reprodução e manutenção vital. No caso dos animais mais idosos, ocorre uma diminuição nesses requerimentos, resultando em obesidade se não forem fornecidas dietas especiais com baixa densidade calórica ou mesmo limitação do consumo alimentar.

Fatores ambientais como o estresse provocado por procedimentos experimentais ou pós-cirúrgicos, tipos de alojamento, bem como a estação do ano, podem interferir nos requerimentos nutricionais, ora aumentando ora diminuindo tais necessidades. Quando os animais são alojados em grupos, é importante observar se os indivíduos de menor grau de dominância social têm acesso à comida e à água.

Na natureza, os primatas consomem grande variedade de alimentos de origem animal e vegetal. Entretanto, as proporções relativas dos diferentes tipos de alimento como frutas, folhosos, ovos de pássaros e invertebrados podem diferir bastante entre as espécies. Em 1981, estudou-se dietas de espécies de primatas e constatou-se que 90% das espécies estudadas consomem frutas; 79% consomem gomas, brotos e flores; 69% consomem folhas maduras; 65% consomem invertebrados; 41% consomem sementes e 37% consomem alimentos de origem animal (incluindo ovos). Infelizmente, é difícil mensurar as proporções dessas dietas, e, conseqüentemente, torna-se impossível determinar a quantidade 'normal' ingerida de fibra, proteína, cálcio, vitamina A e outros nutrientes.

No mercado, existem rações peletizadas, desenvolvidas especialmente para a alimentação de primatas em cativeiro, que diferem em seus componentes nutricionais de acordo com a idade. A formulação da dieta é obtida por meio da mistura de diversos alimentos, várias vitaminas e suplementos minerais, obtendo-se, assim, um produto nutricionalmente adequado. Alguns centros fornecem aos animais do seu plantel apenas a ração peletizada, sendo esta balanceada e capaz de suprir todas as necessidades do animal. Nesse caso, frutas variadas, cereais, grãos, sementes, legumes, verduras, entre outros, são fornecidos exporadicamente, com o intuito de minimizar o estresse.

Atenção especial deve ser dada à água que é fornecida a esses animais, devendo a mesma ser de boa qualidade e servida em abundância, geralmente através de bebedouros automáticos.

Quanto à rotina de alimentação, os animais devem ser alimentados no mínimo duas vezes ao dia, evitando-se, assim, variações bruscas nos teores de glicose sangüínea, estimulando-se os processos fisiológicos e comportamentais e minimizando problemas com a possibilidade de dilatação gástrica. A parte da dieta com teores mais elevados de proteínas, energia, gordura, vitaminas e minerais deve ser oferecida pela manhã. Verduras, frutas, legumes e demais suplementos naturais devem ser sempre servidos à tarde.

Genética

O estudo da genética na área da Primatologia vem crescendo amplamente, visto que um manejo genético adequado constitui a base para um programa de criação duradouro efetivo, com a finalidade de evitar perdas de animais por causa de problemas de consangüinidade, bem como de manter a diversidade genética dentro da colônia. Para atingir esse objetivo, muitos Centros de Primatas formam o *pedigree* de suas colônias e fazem a análise da variabilidade genética através de marcadores genéticos específicos.

Reprodução

Os estudos de campo são bastante úteis para o estabelecimento das colônias de criação. A fisiologia reprodutiva da espécie envolvida constitui a base da manutenção efetiva de uma criação de primatas não-humanos. O sistema de acasalamento é adotado de acordo com a espécie, já que existem exemplares monogâmicos, poligâmicos e promíscuos.

A vida reprodutiva inicia-se no período da puberdade, quando ocorrem alterações dos hormônios sexuais. Nos macacos do Velho Mundo, a puberdade nas fêmeas é identificada com o início da menstruação e da primeira ovulação, que normalmente não ocorre de forma simultânea (Tabela 1). No macho, essa fase é notadamente marcada pelo aumento do diâmetro testicular e pela espermatogênese. As alterações do peso e do tamanho corporal podem ocorrer antes, durante ou após o início desse ciclo reprodutivo, dependendo da espécie. Em muitos casos, principalmente nos primatas do Novo Mundo, o aumento do peso corporal constitui o único método para detecção do início da puberdade, e está diretamente relacionado com a secreção hormonal.

Em decorrência do aumento dos níveis de hormônios sexuais, algumas espécies de primatas do Velho Mundo apresentam um fenômeno conhecido por *sex skin* (Fig. 5). Trata-se de alterações morfológicas externas, manifestadas, tanto nos machos quanto nas fêmeas, por uma vermelhidão que começa primeiramente na pele ao redor da linha pubiana, estendendo-se por debaixo da cauda, da parede abdominal, das nádegas, da porção caudal das costas e da parte interna das coxas, assumindo um formato aproximadamente simétrico, bilateral. O processo continua com inchaços germinados translúcidos dos dois lados da pele ventral da linha pubiana. O primeiro inchaço diminui e os subseqüentes aparecem periférica e progressivamente, desenvolvendo-se em uma inchada e edematosa fase, com rica proliferação vascular, conferindo forte coloração vermelha que, depois de algum tempo, adquire caráter cianótico.

Figura 5 – *Sex skin* em uma fêmea de macaco rhesus, com quatro anos de idade, procedente da colônia de primatas da Fiocruz

Fonte: Departamento de Primatologia do Centro de Criação de Animais de Laboratório / Fiocruz.

Em todos os primatas, o acasalamento ocorre de forma sazonal e se encontra associado a fatores ambientais, tais como: fotoperíodo, temperatura, umidade e disponibilidade de alimento. Os macacos rhesus (*Macaca mulatta*), de acordo com esse fenômeno, apresentam sua 'época de monta' nos meses mais frios do ano – estações do inverno e do outono. Nessa época, a espermatogênese é mais acentuada nos machos, assim como, nas fêmeas, a frequência de ciclos menstruais é mais regular e com presença de ovulação.

Tabela 1 – Ciclos ovarianos de primatas do Velho Mundo

ESPÉCIE	CICLO REPRODUTIVO (DIAS)	MENSTRUAÇÃO(DIAS)	*SEX SKIN*
C. aethiops	30-33	1-2	–
C. patas	30-34	Raro	–
C. talapoin	33	2-6	+
M. mulatta	26-30	4.6	+
M. fascicularis	28-32	2-7	+
M. arctoides	28-29	np*	?
M. cyclopis	29	3.3	+
M. fuscata	26-28	3.5	+
M. nemestrina	29-32	np	+
M. radiata	25-36	10	+
M. silenus	40	2.5	+
M. sinica	29	1-4	–
M. sylvana	27-33	3-4	+
P. entellus	21-26	np	–
P. troglodytes	31-37	3	+
P. pygmaeus	24-32	np	–
G. gorilla	28	np	–

*np: não perceptível; – : ausente; + : presente.
Fonte: Hendrickx & Dukelow (1995).

SISTEMAS DE CRIAÇÃO

Na tentativa de produzir populações de primatas auto-sustentáveis, três métodos de criação são adotados, obedecendo-se principalmente aos aspectos comportamentais, bem como às exigências fisiológicas de cada espécie estudada (Tabelas 2 e 3).

SEMINATURAL

Estabelecido em áreas abertas cercadas, como ilhas naturais ou artificiais, sem que haja quebra do meio ambiente e com provisão de alimentos e água.

Como vantagens desse tipo de sistema de criação, podemos citar que o mesmo atende à grande demanda de primatas usados em pesquisa, apresenta baixo custo de manutenção e pouco trabalho, além de oferecer oportunidade de desenvolvimento de estudos de comportamento das populações.

As desvantagens incluem: custo inicial elevado (instalações, equipamentos, embarcações etc.); a distância das áreas urbanas é grande; o entrosamento social entre os animais ocorre em um período longo (entre 1 a 2 anos); dificuldade de se fazer registro reprodutivo da colônia; dificuldade de reintrodução de animais e de observação; e captura de animais requeridos pela pesquisa.

CRIAÇÃO EM GRUPO

Os animais poligâmicos são alojados em gaiolas coletivas, em um sistema de harém, tanto em ambiente interno quanto externo. Pode-se adotar o sistema de múltiplos machos ou apenas um reprodutor, na proporção de um macho para 3 a 12 fêmeas, obedecendo as necessidades de espaço para a espécie considerada. As fêmeas grávidas podem ser removidas na época do parto ou serem mantidas no mesmo ambiente.

Nesse sistema de criação, a higienização e a alimentação são facilitadas, porém é difícil realizar um eficiente controle de cruzamento entre fêmeas e machos e, conseqüentemente, há dificuldade de estabelecer dados precisos de concepção, principalmente no caso de um sistema de múltiplos machos. A harmonia social também é comprometida, havendo muitos desentendimentos entre os animais, sendo, dessa forma, necessárias intervenções de técnicos e veterinários para tratamentos de animais que sofreram traumas por brigas.

Criação individual

Nesse sistema, as fêmeas são alojadas em gaiolas individuais ou em pequenos grupos separadas dos machos, e apenas no período reprodutivo são colocadas junto a eles. Embora dispendioso, tal sistema permite fazer registros acurados de reprodução e de tempo de gestação. Além disso, é possível realizar exames clínicos e laboratoriais mais facilmente, permitindo fazer descartes de reprodutores(as) com segurança.

Tabela 2 – Espaços recomendados para manutenção de primatas em laboratório

PESO DO ANIMAL (kg)	ÁREA DO PISO/ANIMAL (m^2)	ALTURA (cm)
< 1	0,15	50,8
1-3	0,28	76,2
3-10	0,40	76,2
10-15	0,56	81,28
15-25	0,74	91,44
> 25	2,33	213,36

Fonte: Kelley & Hall (1995).

Para os gêneros *Brachyteles*, *Hylobates*, *Symphalangus*, *Pongo* e *Pan*, a altura da gaiola deverá ser maior, de forma que o animal possa se pendurar no teto e se balançar livremente sem tocar os pés no piso da gaiola. Os animais que pesam acima de 50 kg devem ser alojados em gaiolas estacionárias, de alvenaria.

Enriquecimento e Controle Ambiental

De acordo com comportamentos inerentes de cada espécie, o enriquecimento ambiental consiste em uma série de medidas que modificam aspectos físicos e sociais, aprimorando a qualidade de vida dos animais cativos. Os primatas são utilizados nas pesquisas em substituição ao homem, na busca de reproduzir as condições fisiológicas e patológicas que ocorrem nos humanos. Por uma questão humanitária, e na tentativa de proporcionar ao máximo o bem-estar animal, o trabalho de enriquecimento ambiental direcionado aos nossos 'primos' ancestrais é hoje reconhecido mundialmente, tornando-se atividade obrigatória em todos os centros de criação. Esse trabalho objetiva reduzir a condição estressante promovida pelo cativeiro, resultando em pesquisas de boa qualidade.

Inúmeros programas de enriquecimento ambiental são utilizados para buscar o equilíbrio psicológico dos primatas. Poleiros, balanços, tambores, brinquedos, música ambiente, alimentos variados, fornecidos de forma não repetitiva, constituem algumas estratégias importantes para aguçar a curiosidade desses animais sociáveis, uma vez que esses recursos propiciam uma quebra na sua rotina diária tão necessária para melhorar a condição vital, assim como ocorre com o próprio homem (Fig. 6).

Figura 6 – Curral destinado à criação de macacos rhesus (*Macaca mulatta*), com poleiros, abrigos e tambores

Fonte: Centro de Primatas da Califórnia, EUA.

O controle do ambiente onde se encontra o animal tem grande importância, devendo estar adequado a cada espécie de primata. Temperatura, umidade e iluminação são fatores que devem ser cuidadosamente observados, pois caso estejam inadequados, podem levar ao surgimento de doenças que comprometem toda a colônia em razão do estresse produzido. O alojamento do animal deve ser o mais protegido possível de ruídos, pois o excesso de barulho também trará danos à saúde do animal.

Quanto à temperatura, primatas do Velho Mundo podem se adaptar com facilidade a temperaturas de 19 ºC, excetuando-se os babuínos e os macacos japoneses, que podem se adaptar a temperaturas mais baixas. Os primatas do Novo Mundo devem ser mantidos em temperatura entre 22 ºC e 26 ºC. É aconselhável que se diminua a temperatura durante a noite, reproduzindo o que ocorre no ambiente selvagem. A umidade relativa do ar deve ser mantida entre 45% e 60% para a maioria das espécies, devendo ser maior do que 60% para espécies neotropicais.

A iluminação deve ser controlada em instalações que não têm janelas exteriores, devendo haver um *timer* de controle do tempo de iluminação, promovendo, assim, um ciclo de luminosidade regular.

Contenção Animal

O manejo desses animais deve ser acompanhado de muita precaução, não devendo subestimar a sua força e tenacidade, pois apresentam reações imprevisíveis, podendo ocasionar ferimentos graves aos tratadores. Sendo assim, no momento de lidar diretamente com os mesmos, o uso de roupas protetoras, botas e luvas torna-se estritamente necessário.

Quando se deseja capturar ou remover animais alojados em grupos, o puçá é um material de contenção eficaz, porém é uma técnica que estressa em demasia os animais. É aconselhável que o recinto tenha um túnel com uma gaiola de contenção em sua extremidade, induzindo-se a entrada do animal na mesma.

A contenção animal pode ser realizada de duas formas: física e química. Na contenção física, o animal é capturado com auxílio do puçá e a partir daí é imobilizado por meio de procedimentos técnicos padronizados de acordo com a espécie. Sempre que necessário, a contenção química é realizada, sendo o cloridrato de ketamina o anestésico dissociativo de eleição para a maioria dos primatas.

Exame Periódico do Animal

A colônia freqüentemente deve ser observada por técnicos treinados e qualquer alteração de comportamento e surgimento de sintomas anormais têm de ser imediatamente relatados ao médico veterinário responsável. Os animais devem ser pesados periodicamente, assim como devem passar por uma avaliação clínica freqüente.

A aplicação de tuberculina é obrigatória e deve ser feita no mínimo uma vez por ano para detecção da tuberculose. Nos primatas, o procedimento de tuberculinização é realizado através da administração intrapalpebral, e as reações são observadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação do produto (Fig. 7).

Figura 7 – Aplicação de tuberculina em um primata não-humano

Fonte: Departamento de Primatologia do Centro de Criação de Animais de Laboratório / Fiocruz.

Em centros em que não há controle efetivo de parasitas, é importante fazer vermifugação profilática. Exames hematológicos devem ser feitos quando há suspeitas de enfermidades diversas. O animal é devidamente registrado, recebendo um número individual. Para identificação do animal, é muito freqüente adotar o sistema de tatuagem, feita em partes variadas do corpo, dependendo do porte do mesmo. Em animais grandes, geralmente a tatuagem é feita na região peitoral (Fig. 8), enquanto os pequenos recebem tatuagem na face interna da coxa e, eventualmente, adota-se o uso de colares. Em currais, onde se encontram várias famílias, além da identificação no peito, costuma-se pintar uma parte do corpo do animal, discriminando a geração daquele indivíduo.

Figura 8 – Identificação do animal através de tatuagem na região peitoral

Fonte: Departamento de Primatologia do Centro de Criação de Animais de Laboratório / Fiocruz.

Higienização

Para manter um nível constante de higienização adequado, a descontaminação de todas as instalações e fómites de animais é primordial para o bem-estar da colônia, especialmente quando diz respeito a primatas, a fim de prevenir a disseminação de doenças e de reduzir e controlar os helmintos. A prática de higienização deve ser feita diariamente. Recomenda-se a utilização de solução de hipoclorito de sódio na diluição de 1:100 ou produtos similares, que podem ser usados em todos os tipos de pisos, paredes, portas e outras superfícies. Para esterilizar o ambiente, a fumigação com paraformaldeído ou similares também é aconselhável após o término de um programa de quarentena.

Cuidados no Manuseio com Primatas

É obrigatório o estrito cumprimento das normas de higiene pessoal e coletiva, bem como o uso de calçados e roupas protetoras. Para tanto, o local de trabalho deve fornecer todo o material necessário em quantidades suficientes para o seu uso diário, possibilitando a manutenção do asseio. Além de chuveiros e armários, as instituições devem fornecer serviços de lavanderias, evitando assim um maior contato entre os funcionários e as secreções e dejetos provenientes dos animais.

A equipe técnica deve ser submetida a exames médicos periódicos, inclusive a testes de diagnósticos para a detecção de enfermidades transmissíveis aos animais e ao homem. Os profissionais que trabalham diretamente com os primatas devem ser vacinados contra sarampo, tétano e devem fazer o teste de tuberculina anualmente.

Recomendações sobre o Uso de Primatas

Cinco critérios básicos devem ser seguidos quando se usam primatas em pesquisa:

- os primatas devem ser usados em pesquisa, apenas quando não é possível obter os mesmos resultados experimentais em outras espécies de animais;
- a espécie de primata, selecionada para uma determinada pesquisa, deve ser considerada ideal para a elaboração da mesma;
- o número de animais propostos deve ser o mínimo possível capaz de garantir resultados científicos confiáveis;
- os primatas não serão sacrificados no curso ou no fim do experimento, a menos que esse procedimento faça parte da pesquisa;
- caso o sacrifício seja necessário, este deve ser feito com um encadeamento de ações, visando à conservação e ao aproveitamento máximo da carcaça, para que ela possa ainda ser aproveitada em outros estudos.

Referências Bibliográficas

HENDRICKX, A. G. & DUKELOW, W. R. Reproductive biology. In: BENNETT, B. T.; ABEE, C. R. & HENRICKSON, R. (Eds.) *Nonhuman Primates in Biomedical Research: biology and management*. San Diego: Academic Press, 1995.

KAVANAGH, M. *A Complete Guide to Monkeys, Apes and Other Primates*. New York: The Viking Press, 1984.

KELLEY, S. T. & HALL, A. S. Housing. In: BENNETT, B. T.; ABEE, C. R. & HENRICKSON, R. (Eds.) *Nonhuman Primates in Biomedical Research: biology and management*. San Diego: Academic Press, 1995.

Bibliografia

BOURNE, G. H. *The Rhesus Monkey*. New York: Academic Press, 1975.

DE LUCCA, R. R. et al. (Orgs.) *Manual Para Técnicos em Bioterismo*. São Paulo: Winner Graph, 1996.

HARDIN, R. S. O. An order of omnivorous: nonhuman primates in the wild. In: HARDIN, R. S. O. & TELEKI, G. (Eds.) *Omnivorous Primates: gatthering and hunting in human evolution*. New York: Columbia University Press, 1981.

HENDRICKX, A. G. & DUKELOW, W. R. Breeding. In: BENNETT, B. T.; ABEE, C. R. & HENRICKSON, R. (Eds.) *Nonhuman Primates in Biomedical Research: biology and management*. San Diego: Academic Press, 1995.

HLADIK, C. M. Diet and evolution of feeding strategies among forest wild. In: HARDIN, R. S. O. & TELEKI, G. (Eds.) *Omnivorous Primates: gatthering and hunting in human evolution*. New York: Columbia University Press, 1981.

RALLS, K.; BRUGGER, K. & BALLOU, J. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. *Science*, 206:1101-1103, 1979.

ROSENBLUM, L. A. & ANDREWS, M. W. Environmental enrichment and psychological well-being of nonhuman primates. In: BENNETT, B. T.; ABEE, C. R. & HENRICKSON, R. (Eds.) *Nonhuman Primates in Biomedical Research: biology and management*. San Diego: Academic Press, 1995.

Rylands, A. B.; Pádua, C. V. & Silva, R. R. Order primates (Primates). In: Fowler, M. E. & Cubas, Z. S. (Eds.) *Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals*. Ames: Iowa State University Press, 2001.

Smith, D. G. Potential for cumulative inbreeding and its effects upon survival in captive groups of nonhuman primates. *Primates*, 21:430-436, 1980.

Smith, D. G. Use of genetic markers in the colony management of nonhuman primates: a review. *Laboratory Animal Science*, 32:540-546, 1982.

Swenson, M. J. & Reece, W. O. Processos reprodutivos do macho. In: Dukes, M. J. S (Ed.) *Fisiologia dos Animais Domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

VandeBerg, J. L. Genetics of nonhuman primates. In: Bennett, B. T.; Abee, C. R. & Henrickson, R. (Eds.) *Nonhuman Primates in Biomedical Research: biology and management*. San Diego: Academic Press, 1995.

20

Principais Doenças de Primatas Não-Humanos

Márcia Cristina Ribeiro Andrade

Introdução

Em virtude da proximidade evolutiva e das características filogenéticas semelhantes ao homem, os primatas não-humanos constituem valiosos 'reagentes biológicos' nas pesquisas e a sua utilização ocorre desde 1884, com os estudos de Pasteur. São considerados animais nobres (não-convencionais) em pesquisas, sendo o seu uso restrito e, portanto, utilizados apenas quando não há possibilidades de se obter resultados satisfatórios a partir de animais de laboratório criados para essa finalidade, tais como os roedores e os lagomorfos.

Os primatas não-humanos são transmissores em potencial de diversas doenças e o seu convívio com o ser humano é extremamente arriscado, visto que albergam uma grande gama de vírus e bactérias e são altamente susceptíveis a infecções comuns ao homem. Por esse motivo, os símios representam modelos adequados para experimentações científicas, simulando de forma satisfatória o curso patogênico de diversas doenças que afetam o homem.

Dessa forma, por serem animais considerados de alto risco biológico, o controle ambiental do local onde se encontram os animais é de grande importância, devendo ser adequado a cada espécie de primata. Temperatura, umidade e iluminação são fatores que devem ser cuidadosamente observados. Além disso, as medidas de biossegurança devem ser altamente rigorosas, já que o estresse do animal pode facilitar o surgimento de diversas doenças, comprometendo toda a colônia, assim como a saúde dos seres humanos.

A seguir, são apresentadas algumas doenças que acometem primatas não-humanos e descritas aquelas de maior relevância, pelo fato de aparecerem com maior freqüência em um Centro de Criação e Produção.

Doenças de Maior Relevância para os Primatas Não-Humanos

Doenças Virais

Quadro 1 – Doenças virais

Febres Hemorrágicas	Marburg, Ebola, Febre hemorrágica símia, Febre amarela, Dengue
Herpesvírus	Herpes B, *Herpesvirus saimiri*, Epstein-barr, Cytomegalovirus
Hepatites Virais	Hepatites A, B, C, D, E e Hepatite em *Callithrichidae*
Retrovírus	Oncovírus tipos B, C e D, Lentivírus
Poxvírus	*Monkey pox*

Quadro 1 – Doenças virais (continuação)

Paramyxovirus	Sarampo, Influenza (gripe), SV5, SV41
Picornavírus	Poliomielite, Coxsackie, Rhinoviruse
Togavirus	Rubéola
Rhabdovirus	Raiva, Estomatite vesicular

Febre Hemorrágica Símia

Etiologia: gênero *Filovirus*, família Filoviridae.

Doença extremamente virulenta, 100% letal, que leva à morte por coagulação intravascular disseminada em um período de três dias após o surgimento dos sintomas clínicos. Estes incluem epistaxe, ataxia, anorexia e letargia. Os surtos de febre hemorrágica símia não são freqüentes.

Diante de qualquer sintoma sugestivo da doença, o animal deve ser isolado dos demais e eliminado após a confirmação, feita por meio de testes sorológicos.

Hepatite A

Etiologia: gênero *Picornavirus*, família Picornaviridae.

Os símios são os únicos animais que se infectam de modo natural, principalmente os chimpanzés (*Pan troglodytes*). Após o reconhecimento da transmissão natural de primatas não-humanos aos homens, renovaram-se esforços para utilizar esses animais como modelos. Os mais utilizados são os primatas da espécie *Saguinus mystax*, por serem os mais susceptíveis.

Geralmente, a infecção é clinicamente inaparente. Há casos de enfermidade clínica com insuficiência hepática aguda, mas normalmente os animais se recuperam.

Para prevenir a transmissão da hepatite A dos primatas ao homem, recomenda-se fazer higiene pessoal e utilizar roupas protetoras adequadas, quando se for manejar primatas ou suas secreções naturais, além de administrar doses profiláticas de imunoglobulina às pessoas que estão em contínuo ou freqüente contato com símios jovens recém-importados.

Herpes B

Etiologia: *Herpesvirus simiae*, família Herpesviridae.

A infecção ocorre de modo natural entre os primatas do gênero *Macaca*. Nos animais susceptíveis, a enfermidade é benigna, passando muitas vezes despercebida, semelhante à enfermidade produzida por *Hespervirus hominis* no homem. A infecção primária ocorre em animais jovens. A lesão mais comum se localiza na boca, sobre toda a língua, podendo ocorrer também na borda mucocutânea dos lábios e na conjuntiva da pele, e consiste na presença de vesícula que evolui para uma úlcera. Todo o processo não dura mais do que 7 a 14 dias e não deixa cicatrizes nem afeta o estado geral. Muitos dos animais infectados podem ser portadores do vírus por toda a vida e eliminam o agente de forma intermitente pela saliva.

No homem, *Herpesvirus simiae* produz uma enfermidade altamente letal. A infecção ocorre por meio de mordeduras ou arranhaduras. Pode haver formação de vesícula no ponto da ferida, seguida de linfangite e linfadenite. A infecção generalizada manifesta-se com o aparecimento de febre, cefaléia, náuseas, dores abdominais, diarréia, faringite vesicular, retenção urinária e pneumonia. Os sintomas neurológicos se iniciam por dores musculares, vestígios, espasmos diafragmáticos, dificuldade de deglutição e dores abdominais.

Posteriormente, ocorre paralisia flácida das extremidades inferiores, que se estende às extremidades superiores e ao tórax, culminando em um colapso respiratório.

Um diagnóstico sorológico adequado é de suma importância para se estabelecer colônias de primatas não-humanos livres de *Herpesvirus simiae*. Todos os animais recém-importados devem ser mantidos em quarentena por 6 a 8 semanas e todos os que apresentem lesões herpetiformes devem ser eliminados.

Sarampo

Etiologia: gênero *Morbillivirus*, família Paramyxoviridae.

Grande parte das infecções se apresenta de forma subclínica. A maioria dos surtos de sarampo clínico ocorre em animais recém-importados; portanto, supõe-se que o estresse de captura, confinamento e transporte constituem fatores importantes para que a infecção se manifeste clinicamente.

A sintomatologia é variável, podendo-se apresentar ou não erupções cutâneas, coriza mucopurulenta, rinite, conjuntivite, tosse seca, pneumonia e edema periorbital e facial.

Todas as evidências indicam que os primatas não-humanos adquirem a infecção por exposição ao homem.

Doenças Bacterianas

Quadro 2 – Doenças bacterianas

Infecções sistêmicas	Tuberculose, Hanseníase, Salmonelose, Tétano, Pseudomonose
Infecções gastrointestinais	Shigelose, Campylobacteriose, Yersiniose
Infecções respiratórias	*Streptococcus pneumoniae, Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae, Hemophilus influenzae, Pseudomonas*, *Proteus*, *Corynebacterium*

Campilobacteriose

Etiologia: *Campylobacter jejuni*.

Importante zoonose cuja manifestação é de moderada a severa enterocolite, caracterizada por febre, mal-estar, náuseas, mialgia, dor abdominal e diarréia aquosa e fétida. A doença pode ser fatal em crianças e adultos imunodeprimidos.

A transmissão, geralmente, ocorre por via oral e os animais podem ser portadores assintomáticos. Por causa da alta incidência de portadores sadios, o isolamento do agente no sangue e nas fezes não é prova suficiente; por isso, convém comprovar por meio de provas sorológicas o aumento do número de anticorpos. Uma vez comprovada a infecção, o animal deve ser isolado e devidamente tratado.

Salmonelose

Etiologia: *Salmonella enteritidis* e *S. typhimurium* são as principais.

É uma das doenças de maior prevalência. Consiste em uma infecção sistêmica que pode ser encontrada não apenas nas fezes, como também no sangue e na urina. Animais aparentemente saudáveis podem albergar o patógeno em seus gânglios ou podem ser portadores e eliminadores do agente pelas fezes, de forma transitória, intermitente ou persistente. Os sintomas principais são dores abdominais, náuseas, vômitos e diarréia.

A ração contaminada desempenha importante papel como veículo da infecção.
A confirmação do diagnóstico clínico ocorre por meio de tipificação sorológica e do isolamento do agente etiológico no material fecal.

Shigelose

Etiologia: *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri* e *S. sonnei* são as mais encontradas.

Trata-se de uma importante zoonose que acomete os humanos e os símios, sendo responsável pela maior causa de morbidade e mortalidade entre os símios durante o período de quarentena. O período de incubação, em geral, dura menos de quatro dias. A enfermidade se inicia com febre e dores abdominais, seguidas de diarréia e desidratação, por 1 a 3 dias. Uma alta porcentagem (32% a 64%) de animais sobreviventes torna-se assintomática e alberga a bactéria nas fezes.

A transmissão ocorre por meio da contaminação fecal dos alimentos, e o agente pode se multiplicar e sobreviver por um longo período em vegetais. A infecção se propaga com rapidez nas colônias em razão dos hábitos anti-higiênicos dos animais, que defecam sobre o piso da gaiola, onde muitas vezes são depositados os seus alimentos.

O diagnóstico é feito com o isolamento do agente etiológico em meios seletivos e mediante identificação e tipificação sorológica.

Um controle eficaz inclui o isolamento e o tratamento dos animais afetados ou portadores, bem como a higienização adequada dos fómites e gaiolas.

Tétano

Etiologia: *Clostridium tetani*.

O tétano consiste em uma toxemia causada por neurotoxina específica que se forma no tecido infectado por *Clostridium tetani*. Os esporos do bacilo se encontram sobre os solos cultivados, ricos em matéria orgânica, sendo mais comum em climas tropicais. Portanto, o reservatório e a fonte de infecção é o solo que contém *C. tetani*.

Na maioria dos casos, o agente é introduzido nos tecidos por meio de ferimentos, particularmente nos de tipo pontiagudos e profundos. As condições favoráveis para multiplicação ocorrem quando uma pequena quantidade de terra ou um objeto estranho causa necrose tecidual. A bactéria permanece localizada no tecido necrótico do local original da infecção. À medida que cessa a multiplicação, as células bacterianas sofrem autólise e a neurotoxina então é liberada, causando espasmos e contrações tônicas da musculatura voluntária pela irritação na célula nervosa.

Recomenda-se que todas as pessoas que trabalham com os animais sejam vacinadas.

Tuberculose

Etiologia: o agente etiológico mais comum é *Mycobacterium tuberculosis*, porém há relatos também de infecção por *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum* e *M. intracellulare*.

É uma doença comum em símios mantidos em cativeiro, podendo ser de curso crônico ou subagudo e o período de incubação, geralmente, é de 1 a 3 meses. A infecção pode ser adquirida por meio de alimentos contaminados ou por contato com símios ou humanos infectados. A tuberculose é a doença bacteriana mais importante dos primatas não-humanos em função da sua capacidade de se disseminar rapidamente.

A tuberculose ocorre em todas as espécies de primatas, mas a susceptibilidade é variável. Os macacos do Velho Mundo são mais susceptíveis do que os do Novo Mundo. Os sinais clínicos da tuberculose não são evidentes até que o quadro esteja bastante avançado; os animais que aparentam estar em boas condições clínicas podem estar afetados severamente. Os sintomas mais comuns são tosse, perda progressiva de peso, fadiga e prostração.

O diagnóstico da doença é feito mediante sinais clínicos, teste de tuberculina, raios X e isolamento do agente. O teste de tuberculina é válido, mas podem ocorrer reações de caráter falso positivo e falso negativo. São observadas lesões típicas, principalmente nos pulmões e intestinos.

Para o controle efetivo da doença, todos os animais que apresentam reações positivas de tuberculina devem ser eliminados e todas as carcaças incineradas.

Por se tratar de uma doença altamente transmissível, todas as pessoas que trabalham diretamente com esses animais devem fazer exames periódicos, visando a eliminar a possibilidade de humanos transmitirem tuberculose aos animais e vice-versa.

Doenças Parasitárias

Quadro 3 – Doenças parasitárias

Helmintos	Acantocefalose, Estrongiloidose, *Enterobius* spp, Esofagostomose, Ascaridiose, *Trichuris trichura*, Ancilostomose, *Trichostrongylus* spp
Cestódeos	*Hymenolepis nana*
Trematódeos	Esquistossomose, *Fasciola* sp
Protozoários	Malária, Toxoplasmose, Tripanossomíase, Leishmaniose, *Pneumocystis carinii*, Amebíase, *Balantidium coli*, *Trichomonas* spp, Giardíase, Criptosporidiose.
Ácaro	*Pneumonyssus simicola*

Amebíase

Etiologia: *Entamoeba histolytica*.

A amebíase é uma protozoose de importância que acomete os primatas não-humanos. As cepas de *E. histolytica* encontradas em primatas são idênticas às encontradas no homem, podendo ser transmitida a indivíduos que lidam com uma grande população, como no caso de pesquisas científicas e criações.

A infecção por *E. histolytica* ocorre em muitas espécies de primatas não-humanos. Os macacos rhesus (*Macaca mulatta*) são geralmente resistentes, apresentando-se assintomáticos. Com exceção dos sagüis, não susceptíveis à amebíase, os macacos do Novo Mundo são mais sensíveis do que os do Velho Mundo. Os sintomas consistem em dor abdominal e evacuações hemorrágicas.

O reservatório da *E. histolytica* é o homem; a infecção se transmite por via fecal-oral. Os alimentos e a água contaminados com fezes contendo os cistos do protozoário constituem as principais fontes de infecção.

O diagnóstico laboratorial é feito por meio de exames parasitológicos e provas sorológicas. As medidas profiláticas consistem em saneamento ambiental, provisão de água potável, eliminação sanitária das fezes, higiene pessoal e higiene dos alimentos.

Ácaro pulmonar

Etiologia : *Pneumonyssus simicola*.

Pneumonyssus simicola ocorre com a alta incidência em primatas não-humanos. Geralmente não há sinais clínicos. Em alguns casos, os animais podem apresentar úlceras e diarréias. O isolamento do agente, tanto na forma larvar quanto na adulta, pode ser feito por meio de lavados pulmonares.

À necropsia são observadas pequenas lesões pulmonares císticas e granulomatosas, variando em número e extensões, as quais muitas vezes podem ser confundidas com lesões provocadas por tuberculose. Os animais infectados devem ser sacrificados. Um controle eficaz para a doença ainda é desconhecido.

É importante esclarecer que algumas enfermidades supramencionadas são específicas de primatas não-humanos, outras ocorrem indistintamente.

Bibliografia

Acha, P. N. & Szyfres, B. *Zoonosis y Enfermidades Transmissibles Comunes al Hombre y a los Animales*. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 1989.

Adams, S. R.; Muchmore, E. & Richardson, J. H. Biosafety. In: Bennet, B. T.; Abee, C. R. & Henrickson, R. (Eds.) *Nonhuman Primates in Biomedical Research: biology and management*. New York: Academic Press, 1995.

Amstutz, H. E. et al. *Manual Merck de Veterinária*. São Paulo: Roca, 1991.

De Luca et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Dulbecco, R. & Ginsberg, H. S. *Microbiologia de Davis*. São Paulo: Harper & Row do Brasil Ltda., 1974.

Fiennes, R. *Zoonoses of Primates*. London: William Clowes and Sons, 1967.

Fowler, M. E. *Zoo and Wild Animal Medicine*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1986.

Rey, L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

Seamer, J. H. & Wood, M. *Safety in the Animal House*. London: Laboratory Animals Ltd, 1981.

Whitney, R. A. *International Requirements for Nonhuman Primates in Medical Research*. In: First Inter-American Conference on Conservation and Utilization of American Nonhuman Primates in Biomedical Research, 1976, Washington, D.C.: Pan American Health Organization (OPS).

Criação e Manejo de Cães

Paulo Guilherme da Silva Sá

Introdução

Todos os cães pertencem a uma só espécie (*Canis familiaris*), com múltiplas raças e variedades, descendendo provavelmente do lobo sul-americano (*Canis lupus pallipes*). Após milhares de anos de domesticação, a espécie difundiu-se rapidamente pelo planeta, sendo encontrada desde as regiões equatoriais e tropicais até o Ártico (Hubrecht, 1995).

Já no antigo Egito, os cães vão surgir retratados em papiros e pinturas, como é o caso das raças *basenji* e *afghan-hound*, contando já com aproximadamente 5 mil anos, como também em esculturas representando o deus Anúbis (o guardião dos mortos). Essas duas raças não estão perfeitamente representadas nas atuais (Correa & Correa, 1982).

Quando os exploradores chegaram ao continente americano, trouxeram seus cães, mas já encontraram aproximadamente 20 raças americanas, das quais hoje só restam duas: o cão pelado mexicano, assim chamado por não possuir pêlos, e o cão dos esquimós. Na Austrália restou o dingo, hoje selvagem e também semidomesticado pelos aborígenes. Em toda a África restaram cães, dos quais o mais antigo é o *basenji*, que se espalhou por esse continente, sul da Ásia e Índia; possivelmente foi esse cão que chegou à Austrália e, através dos milênios, se transformou no dingo. Em toda a Ásia e ilhas do Pacífico, existiram outras raças de cães ancestrais (Correa & Correa, 1982).

Atualmente, o homem seleciona os cães de acordo com as qualidades que lhe interessam, entre as quais podemos citar porte, beleza, agilidade, faro, pelagem e comportamento instintivo. Por meio de cruzamentos inter-raciais e seleção artificial é também possível criar novas raças que atendam a critérios específicos.

Para fins experimentais, a raça mais utilizada é o *beagle*, em razão de seu porte médio (10 kg-25 kg), temperamento dócil e padronização racial.

Considerações quanto à Utilização de Cães em Experimentos

O Projeto de Lei Federal nº 3.964, de 05 de fevereiro de 1998, discorre sobre a criação e a utilização de animais para ensino e pesquisa no Brasil, e revoga a Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979. Entre as diversas disposições desse projeto de lei, estão a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) e a obrigatoriedade da constituição de Comissões de Ética no Uso de Animais (Ceua) para o credenciamento das instituições que realizam atividades de ensino e pesquisa com animais.

Considerações quanto ao Espaço Físico Destinado aos Cães de Laboratório

Existem algumas especificações relativas à manutenção de cães em biotérios que devem ser seguidas a fim de facilitar o manejo dos animais, evitar estresses desnecessários e prevenir enfermidades – físicas e emocionais – dos cães. São elas:

- os boxes devem ser individuais ou duplos, a menos que se disponha de um sistema de monitoramento contínuo dos cães;
- a área deve ser compatível com o tamanho dos animais que abriga; considerando o cão-padrão para experimentos científicos – o *beagle*; a área mínima deve ser de 4,5 m^2. Restrições quanto ao espaço físico afetam o bem-estar geral e o comportamento dos cães, podendo provocar estereótipos locomotores ou estresse;
- a altura deve ser suficiente para que os tratadores e pesquisadores se mantenham de pé;
- as paredes devem ser lisas, impermeáveis, de fácil higienização e não podem apresentar rachaduras;
- os boxes devem ser divididos em uma área coberta e outra descoberta para que o animal possa desfrutar de abrigo, ventilação e sol;
- a iluminação deve ser reduzida ao mínimo necessário no período noturno, a fim de permitir o repouso do cão;
- a temperatura deve ser mantida entre 15 °C e 24 °C, com umidade relativa de aproximadamente 55%. No caso de recém-nascidos, a temperatura deve ser mantida entre 26 °C e 28 °C durante as duas primeiras semanas (Hubrecht, 1995);
- os boxes-maternidade devem ser individuais, silenciosos e com espaço físico suficiente para possibilitar que a mãe amamente com tranqüilidade os filhotes;
- o piso deve possuir características que facilitem o escoamento dos dejetos durante a limpeza, apresentando uma textura intermediária entre o liso e o áspero;
- os boxes devem proteger o animal do frio, vento e calor excessivos, e possuir uma 'cama' para seu descanso, que pode ser de madeira desde que evite o contato dele com o chão frio.

O *design* dos boxes é extremamente importante, uma vez que seu arranjo no biotério deve possibilitar a transferência temporária dos cães para outros boxes durante a limpeza dos mesmos, por exemplo. A intercomunicação entre os boxes (individuais ou duplos) também deve ser permitida quando desejado. Igualmente, o confinamento dos cães em boxes individuais e a aglomeração de mais de quatro animais em um mesmo boxe por períodos prolongados devem ser evitados para prevenir a ocorrência de anomalias comportamentais como a apatia e a agressividade (Bebak & Beck, 1993).

Redução do Estresse

O manejo de um cão deve ser realizado, sempre que possível, pelos mesmos tratadores e pesquisadores. Caso isso não seja viável, as técnicas de manejo devem ser padronizadas, o que torna imprescindível o treinamento conjunto de toda a equipe diretamente envolvida com os cães no biotério.

Outro fator de estresse que pode ser reduzido é o ruído, cujo controle deve ser considerado no *design* dos boxes e do biotério como um todo. O uso de materiais abafadores de ruído e de portas acústicas, bem como de corredores amplos, permite minimizar o ruído a que cães, funcionários e pesquisadores estarão sujeitos (Milligan, Sales & Khirnykh, 1993).

Alimentação

Como todos os carnívoros, o cão precisa de alimentos bem absorvíveis e balanceados; eles devem fornecer proteínas para crescimento e vigor, representadas por carnes, ovos, leite e laticínios; carboidratos como o arroz, o trigo e outros; lipídios ou gorduras que tanto fornecem energia como dão forma ao corpo; minerais como o cálcio e o fósforo para os ossos, o ferro para evitar a anemia, favorecendo a formação de hemoglobina nos glóbulos vermelhos do sangue; o sódio, o potássio e numerosos outros elementos (Correa & Correa, 1982).

As vitaminas presentes nesse tipo de dieta estimulam as funções vitais, como a vitamina A, que favorece a absorção de alimentos; as vitaminas do grupo B, imprescindíveis ao metabolismo e à respiração celulares; a vitamina C, que estimula a reparação de feridas e lesões e fortalece os vasos sangüíneos; a vitamina D, que comanda a calcificação dos ossos; a vitamina E, importante na reprodução e antioxidante biológico, e a vitamina K, necessária para a coagulação do sangue (Correa & Correa, 1982).

No caso da opção por rações comerciais, deve-se atentar para a especificidade envolvida na idade dos cães: há rações mais ricas em proteínas e energia para filhotes em crescimento, até os seis meses de idade, e rações de manutenção, que devem ser oferecidas após seis meses ou um ano de idade. Um problema potencial das rações comerciais é a monotonia na alimentação, o que pode ser contornado oferecendo-se aos cães, eventualmente, alimentos preparados no biotério.

Necessidades Especiais dos Filhotes

Além de uma alimentação específica e bem balanceada, os cães mantidos em biotérios, quando filhotes, precisam de estímulos sociais e afetivos para se desenvolverem de forma saudável. A chamada socialização primária dos filhotes ocorre naturalmente entre a terceira e a décima segunda semana de vida, quando são estabelecidas as relações com outros cães e com o homem. É também durante esse período que os filhotes se acostumam com seu ambiente físico. Por esses motivos, deve ser dada especial atenção aos estímulos recebidos pelos filhotes nessa fase, intensificando os contatos entre funcionários, pesquisadores e os animais, e oferecendo a estes últimos um ambiente agradável e livre de fatores de estresse (Freedman, King & Elliot, 1961).

Manejos de Rotina

Abordagem do Cão

Primeiramente, a postura do cão deve ser observada – o comportamento típico de um cão acuado é o recuo até o fundo do boxe. Nesse caso, é recomendável que se adote um tom de voz suave e firme, e que a pessoa, ao efetuar a abordagem, abaixe-se até alcançar o mesmo nível do cão. Isso fará com que o animal não se sinta ameaçado. Movimentos bruscos podem estressar o cão, fazendo com que este tome atitudes agressivas e tente morder. Se isso acontecer, tratadores experientes devem ser chamados para auxiliar nos trabalhos de contenção do animal.

Contenção do Cão

Contenção Mecânica

A contenção em recumbência esternal é utilizada na ausência de agressividade por parte do cão, ainda que o uso da mordaça seja recomendável para evitar acidentes. Um cão em recumbência esternal permanece

com o esterno apoiado sobre a mesa de manipulação, ao mesmo tempo em que o tratador coloca o braço sob seu pescoço a fim de controlar os movimentos da cabeça, enquanto segura, com o outro braço, o dorso do animal, apoiando a mão sobre a nuca do cão para evitar que o mesmo se levante. Essa posição facilita a punção de veias cefálicas e jugulares, a aplicação de injeções e pequenos curativos.

Para cães agressivos, no entanto, a forma mais usual de contenção é a coleira-laço, constituída de haste de madeira com uma tira de couro regulável presa na extremidade. Outro instrumento utilizado e que apresenta melhor eficiência é o puçá trançado com fios de náilon ou algodão.

Contenção Química

A aplicação combinada de sedativos e analgésicos é utilizada para o transporte do cão e procedimentos mais traumáticos, durante os quais o cão pode expressar reações de defesa e tentar morder o tratador/pesquisador. Quando usados isoladamente, os sedativos têm um efeito tranqüilizante que auxilia no manejo do animal. Alguns agentes têm também efeito analgésico. No entanto, nenhum analgésico pode ser empregado isoladamente para procedimentos dolorosos, como a cirurgia, atuando somente como pré-anestésico. Para a realização da contenção química, é indispensável a presença de um veterinário, que indicará o tipo de droga e a dosagem a ser empregada de acordo com o tipo de procedimento e as características do animal.

Calendário de Prevenção de Doenças

Cadelas selecionadas para reprodução devem ser vacinadas contra a cinomose cerca de um mês antes do período estral, para que, em caso de fecundação, os filhotes recebam anticorpos protetores contra essa doença, ao mamarem o colostro durante as primeiras 24 horas de nascidos. A vacina contra a parvovirose à base de vírus morto, que também tem como objetivo proteger os filhotes ao mamarem o primeiro leite, pode, ainda, ser aplicada durante a gestação.

A verminose nos recém-nascidos é muito grave e responsável por grande parte das mortes de filhotes com uma a quatro semanas de vida. Para evitar esse risco, entre 30 e 45 dias após o cio e a cobertura pelo macho, é recomendada a aplicação de vermífugo por via oral, a fim de matar larvas de vermes que podem atravessar a placenta e parasitar os filhotes antes de nascidos. De preferência, deve ser escolhida uma marca comercial de tetramizol, administrada na base de 10 mg/kg.

Se por qualquer motivo não for possível imunizar a cadela-mãe antes do parto, ou em caso de morte da mesma ao dar à luz, devem ser adotados os seguintes procedimentos:

- aos 30 dias, vacinação dos filhotes contra a parvovirose, com vacina à base de vírus morto;
- aos 45 dias, vacinação contra a cinomose;
- aos 60 dias, revacinação contra a parvovirose;
- aos 90 dias, vacinação com vacina tríplice (cinomose, hepatite e leptospirose) e aplicação de *droncit* contra a dipilidiose.

Se o parto for normal, se a cadela foi vacinada como exposto e os filhotes mamarem o colostro, devem ser adotados os seguintes procedimentos:

- aos 30 dias, vacinação contra parvovirose, vacina à base de vírus morto;
- aos 60 dias, revacinação contra parvovirose;
- aos 90 dias, vacinação contra cinomose e aplicação de *droncit* contra a dipilidiose;
- aos 120 dias, aplicação de vacina tríplice (cinomose, hepatite e leptospirose);
- após os seis meses de idade, vacinação anual contra a raiva.

Medicamentos e Materiais para Emergências, Acidentes ou Tratamentos de Rotina

Material de Enfermagem

- bandagens e gaze;
- esparadrapo de 2 cm e 5 cm de largura;
- água oxigenada a 10 volumes;
- estanca-sangue para conter pequenas hemorragias;
- algodão hidrófilo;
- sabonete e *shampoo* parasiticida;
- mercúrio-cromo;
- repelente de insetos;
- álcool para aplicação de injeções;
- bisturi de lâmina descartável;
- tesouras de pontas finas, retas, de 12 cm, para curativos;
- pinças de dentes de rato, retas, de 15 cm, para curativos e limpeza de orelhas;
- esterilizadores;
- seringas plásticas de 5 cm^3 e 10 cm^3 para aplicação de injeções e medicamentos por via oral.

Medicamentos

- antibióticos e antiinflamatórios;
- antidiarréicos;
- vermífugos para vermes redondos e vermes chatos;
- vacinas de rotina;
- analgésicos e sedativos de administração interna e externa;
- anestésicos locais e gerais.

Referências Bibliográficas

Bebak, J. & Beck, A. M. The effect of cage size on play and aggression between dogs in purpose-bred beagles. *Laboratory Animal Science*, 43:457-459, 1993.

Correa, W. M. & Correa, C. N. M. *A Saúde do Cão*. Botucatu: J. M. Varela Editores Ltda., 1982. (Série Saúde Animal)

Freedman, D. G.; King, J. A. & Elliot, O. Critical period in the social development of dogs. *Science*, 133:1016-1017, 1961.

Hubrecht, R. Dogs and dog housing. In: Smith, C. P. & Taylor, V. (Eds.) *Environmental Enrichment Information Resources for Laboratory Animals: 1965 - 1995: birds, cats, dogs, farm animals, ferrets, rabbits, and rodents. AWIC Resource Series* n.2. Beltsville – Potters Bar: U.S. Department of Agriculture – MD and Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw). p.49-62, 1995.

Milligan, S. R.; Sales, G. D. & Khirnykh, K. Sound levels in rooms housing laboratory animals: an uncontrolled daily variable. *Physiology and Behaviour*, 53:1067-1076, 1993.

22

arsupiais Didelfídeos:

gambás e cuícas

Ana Maria Jansen

Introdução

Marsupiais têm despertado vivo interesse na cultura ocidental desde que Vicente Pinzón presenteou uma fêmea de gambá aos reis católicos da Espanha. O vocábulo gambá deriva do tupi-guarani e significa 'ventre aberto', ou seja, foi o modo de reprodução que chamou a atenção dos povos pré-coloniais.

A ordem Marsupialia inclui aproximadamente 90 espécies em 11 famílias; predominam na Austrália, onde o relativo isolamento permitiu que ocupassem os nichos ecológicos que em outros continentes são ocupados por dezenas ou mais ordens de placentários. Embora a bolsa marsupial seja o traço referido como característico da ordem, é o trato urogenital que distingue mais significativamente os marsupiais dos demais mamíferos.

Em todos os marsupiais, os dutos urinários passam no meio dos dutos genitais, enquanto nos eutérios estes passam lateralmente. As fêmeas marsupiais apresentam duas vaginas laterais que se unem formando uma vagina mediana. No parto, forma-se um canal de passagem para o feto no tecido conjuntivo entre a vagina mediana e o *sinus* urogenital. Na maioria dos marsupiais esse canal é transitório e será novamente formado em cada novo parto.

A taxa metabólica dos marsupiais é mais baixa em comparação com a dos placentários e a temperatura corporal média é de 35 °C. Ao nascer, um feto marsupial não controla a temperatura corporal – esta coincide com o início da função tireoidiana na metade do período de dependência do marsúpio dos animais. A hibernação não é observada em marsupiais e a resposta a temperaturas altas é caracterizada por aumento da salivação e lambeção dos membros anteriores, transpiração abundante em algumas espécies, polipnéia e aumento da ingestão de água. A maioria dos marsupiais limita a atividade durante o dia.

A Família Didelphidae: o gambá *Didelphis marsupialis*

A família Didelphidae, de ampla distribuição nas Américas e representante do grupo mais antigo de marsupiais (Cretáceo superior), é provavelmente autóctone da América do Sul (Reig, 1961). O gênero *Didelphis* ocorre desde o sudeste do Canadá ao sudeste da Argentina, sendo o gênero *Marsupial* com maior dispersão no mundo (Austad, 1988). As espécies *D. marsupialis* e *D. aurita* ocorrem em matas úmidas tropicais encontradas do sul do México ao norte da Argentina.

Até bem pouco tempo, os marsupiais eram tidos como 'mamíferos inferiores', um elo evolutivo entre ovíparos mamaliformes e vivíparos placentários. Atualmente, sabe-se que as semelhanças entre metatérios e eutérios é muito grande, sendo a característica diferencial seu modo de reprodução: o tempo de geração mais curto – 12 a 13 dias – e a parição de indivíduos quase em estágio embrionário nos metatérios. Um filhote de marsupial pesa 0,01% a 0,05% do peso materno, em contraste com um filhote de placentário que pesa 2% a 3%.

Marsupiais podem ser considerados como um placentário imaturo que dependerá, para o seu desenvolvimento, das condições de 'incubação' do marsúpio. Os marsupiais são considerados amniotas, com saco vitelínico bem desenvolvido, formando, durante a gestação, um tipo de 'placenta' córion-vitelínica coberta por uma membrana cornificada e avascular – envoltório significativamente diferente da placenta córion-alantóide, característica dos eutérios.

A intimidade de um feto marsupial com os tecidos maternos é, portanto, muito menor. Essa intimidade passa a ser importante durante o longo período de lactação. Os filhotes de gambá permanecem, durante os primeiros 55 dias de vida, ligados ao mamilo que alcança o estômago dos neonatos. Somente a partir de então, os filhotes, agora com a boca inteiramente diferenciada, começam a se soltar do mamilo por alguns momentos e a 'explorar' o meio externo. Nessa época, iniciam a experimentar os alimentos que se colocam nas gaiolas.

O aleitamento prossegue até o centésimo dia, com a gradativa independência dos filhotes. A pigmentação das orelhas em *D. marsupialis* é um bom marcador dessa fase e mostra para o bioterista que está na hora de separar os filhotes da mãe, caso contrário acabam por matá-la e devorá-la. É possível deixar apenas um filhote com a mãe durante mais tempo. Um dos recursos comumente usado é fazer rodízio dos filhotes: mantém-se um filhote, ou no máximo dois, por períodos de 24 horas. Esse é um recurso que deve ser cuidadosamente acompanhado para evitar que os filhotes agridam a mãe, e é utilizado quando as ninhadas são pouco robustas. Logo após serem apartados da mãe, é aconselhável colocá-los individualmente em caixas para ratos contendo maravalha no fundo. Nessas caixas devem permanecer até atingirem o peso de, no máximo, 180 g - 200 g, quando então devem ser colocados nas gaiolas mencionadas.

A taxa de crescimento de um marsupial é comparável a dos placentários se o primeiro período de evolução no marsúpio for considerado como período fetal e não pós-natal. A maturidade sexual acontece aproximadamente aos oito meses e a expectativa de vida em cativeiro oscila entre 2 a 4 anos.

Reprodução e Manutenção em Cativeiro

Didelfídeos devem ser mantidos em gaiolas individuais, salvo durante o curto período de corte e acasalamento, do contrário brigam. Vale mencionar que gambás são nômades e solitários. *Didelphis marsupialis* se mantém muito bem em gaiolas de 80 x 80 x 80 cm; *Philander opossum* pode ser mantido em gaiolas convencionais de coelhos.

Caixas pequenas para abrigar os animais durante o dia são imprescindíveis, assim como também os suportes para aumentar a área de atividade. No biotério de marsupiais do Instituto Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), resolvemos esse tipo de problema colocando escadas de madeira dentro dos recintos. O fundo de um galão de plástico pode ser utilizado como abrigo, uma vez que é resistente e facilmente lavável. Caixas de papelão também são indicadas. Vale lembrar que gambás destroem rapidamente essas caixas, as quais têm de ser recicladas com freqüência.

Sempre que possível, deve-se pintar os abrigos de preto para bloquear melhor a incidência de luz. O recinto deve ter ar-condicionado – didelfídeos, sobretudo jovens recém-desmamados, suportam mal as altas temperaturas do verão. Água pode ser oferecida em mamadeiras convencionais, mas o ideal seria a colocação de vasilhames que devem ser limpos diariamente (o hábito de defecação em vasilhas de água é comum nos didelfídeos mantidos em gaiolas). O arame galvanizado a ser usado para a confecção das gaiolas deve ser grosso

e o chão da gaiola deve ser liso, para com isso evitar a formação de ulcerações nas patas e na cauda; as faces laterais devem ser forradas para evitar o contato direto entre animais contíguos. As lesões decorrentes de briga e/ou contato constante com malha de arame freqüentemente infectam e se tornam, às vezes, difíceis de tratar.

Embora sejam poliestros, consideramos o período entre julho e janeiro a estação reprodutiva dos didelfídeos. O ciclo estral é de aproximadamente 30 dias e a cópula restringe-se a 1 ou 2 dias antes da ovulação, mas o esperma não sobrevive mais do que um dia. Pareamento de espermatozóides foi descrito no gênero *Didelphis*. A alta eficiência reprodutiva de gambás é explicada, entre outros, pela capacidade de controlar o sexo da prole. Essa característica poderia esclarecer a sua adaptação às diferentes condições ecológicas, bem como as adaptações necessárias para a eficiente competição com os placentários.

O período de gestação nos didelfídeos é de aproximadamente 13 dias e problemas obstétricos não são relatados. Ao nascer, os gambás não apresentam imunoglobulinas – estas, de origem materna, aparecem a partir das primeiras horas pós-parto.

Um filhote marsupial é surdo e cego; suas patas traseiras e cauda são vestigiais. As patas dianteiras, precocemente desenvolvidas, são equipadas de unhas decíduas que auxiliam o neonato em sua escalada para o marsúpio, o que acontece sem o auxílio materno. Normalmente nasce um número bem maior de filhotes (aproximadamente 22) do que o de tetas (13), porém, no máximo 10 sobrevivem.

Durante os primeiros 55 dias de vida, a boca ainda indiferenciada dos filhotes está selada ao mamilo. A partir de então, começam a se tornar independentes, passando períodos cada vez maiores fora do marsúpio. Com 80 dias, o sistema imune está maduro e com 100 dias os filhotes devem ser separados em gaiolas individuais, do contrário, devorarão a mãe. A pigmentação da orelha, no caso de *D. marsupialis*, é um bom marcador para tal. Uma fêmea Didelphidae investe cerca de 112 dias para criar uma ninhada – da concepção ao desmame. Embora esse período pareça muito longo, vale lembrar que após o desmame os filhotes são inteiramente independentes, o que permitirá duas ou até três ninhadas anuais.

Em nosso biotério, iniciamos o acasalamento no mês de julho. Uma fêmea ladeada por dois machos é colocada individualmente em recintos especialmente destinado a corte e acasalamento dos animais. Tais recintos medem 1,5 m x 1,5 m e são interconectáveis por portinholas, de modo a permitir o livre trânsito dos animais. Aparentemente a fêmea faz sua escolha, que pode ser comprovada pelo fato de o casal passar a usar o mesmo abrigo para dormir durante o dia. Normalmente, permitimos que o par permaneça no mesmo recinto por três dias. O pareamento, portanto, deve ser testado pela observação cuidadosa.

Nunca observamos resposta do tipo afetiva em marsupiais, mas se mantidos em boas condições, após a adaptação em cativeiro, tendem a ser pouco agressivos e facilmente manejáveis.

Transporte

Marsupiais devem ser transportados individualmente, ao abrigo da luz, com ventilação e protegidos de ruídos o quanto possível.

Nutrição

Didelfídeos apresentam uma dentição não especializada, o que lhes confere extrema versatilidade alimentar. Aceitam frutas, pequenos vertebrados, ovos, ração industrializada, insetos, entre outros. As necessidades nutricionais exatas nunca foram estabelecidas para esse modelo animal; Jurgelski (1974) preconiza oferecer 180 g/animal de uma mistura resultante da homogeneização de 5 kg de ração seca para gatos + 1,5 kg de fígado

bovino em 10 litros de água. Fêmeas com filhotes e animais recém-desmamados devem receber o dobro, enquanto aos demais não deve ser permitido alimentar-se *ad libitum*, para evitar a obesidade. Em nosso biotério, oferecemos uma laranja, duas bananas, 80 g de ração seca para cães/animal adultos. Fêmeas com filhotes e animais recém-desmamados recebem uma suplementação de 100 g de ração úmida (prensado de carne de aves).

Manejo

Contenção mecânica – como os didelfídeos procuram abrigo durante o dia, em cativeiro, facilmente podem ser capturados pela cauda e imobilizados pela nuca após permitir que eles se fixem com as unhas sobre algum substrato. Mantê-los ligeiramente contidos evita unhadas na mão que está imobilizando a nuca.

Contenção química – 20 mg/kg - 30 mg/kg de peso de cloridrato de ketamina permitem 20 minutos de contenção segura. Anestesias freqüentes resultam na necessidade do aumento da droga.

Coleta de sangue – pela veia marginal da cauda e femural. A punção intracardíaca permite a coleta de uma amostra maior de sangue.

Doenças

Os seguintes parasitas podem ser encontrados em gambás: *Trypanosoma cruzi, T. rangeli, T. freitasi, Leishmania chagasi, L. brasiliensis, Babesia* sp, *Physaloptera* sp, *Capillaria* sp, *Gnathostoma* sp, *Acantocephala* sp, *Paragonimus* sp. Destes, *Phisaloptera* sp é considerado o único potencialmente virulento, sendo recomendável a vermifugação dos animais infectados. Gambás e cuícas são extremamente resistentes ao veneno das cobras do Novo Mundo, o que significa, além de mecanismo de escape de um predador, uma fonte alimentar alternativa. Mais ainda, suportam o parasitismo por protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, sem danos importantes. São capazes de responder com altos títulos sorológicos aos antígenos de *T. cruzi* – vale mencionar que gambás mantêm os dois ciclos de multiplicação do *T. cruzi*: o parasita se multiplica na forma epimastigota na luz das glândulas de cheiro e também como amastigota intracelular em diversos tecidos. Isso quer dizer que o gambá pode, ao mesmo tempo, ser reservatório e vetor do *T. cruzi*.

A enorme distribuição dos didelfídeos nas Américas se deve principalmente a sua impressionante adaptabilidade. A resistência ao endocruzamento é outro fator favorável à dispersão da espécie, na medida em que apenas um pequeno número de animais é necessário para fundar uma colônia. Apesar de portarem um cérebro descrito como menor do que o dos mamíferos placentários, quando testados comparativamente a cães, gatos, coelhos e cabras, quanto à capacidade de memorizar locais onde podiam encontrar alimentos, os gambás apresentaram o desempenho mais alto.

A divergência entre marsupiais e placentários data de, aproximadamente, 100 milhões de anos. A origem dos marsupiais é discutível. Alguns grupos postulam sua origem na América do Norte, onde teriam sido extintos há 15 milhões de anos enquanto continuavam a se dispersar na América do Sul, chegando até a Austrália, onde, por falta de competidores, aconteceu sua enorme diversificação.

A família Didelphidae conta, atualmente, com mais de 70 espécies distribuídas pelas Américas. O gênero *Didelphis*, encontrado desde o Canadá até a Argentina, é um dos gêneros de mamíferos de mais ampla distribuição nas Américas e inclui quatro espécies: *D. marsupialis*, *D. aurita*, *D. albiventris e D. virginiana,* possivelmente a espécie mais recente e encontrada apenas nos Estados Unidos. Os registros fósseis mais antigos do gênero datam de 4 milhões de anos. Sugere-se, também, que o ressurgimento da ponte terrestre que liga as Américas resultou na colonização do México pelo *D. marsupialis*.

A interação do homem com gambás é antiga: de fato, esses animais resistem bem à ação antrópica no meio ambiente, adaptam-se aos forros das casas, ocos de árvores e outros abrigos; sobrevivem bem 'pilhando' restos alimentares do homem. Este, freqüentemente os utiliza como fonte de proteínas. Atualmente, a tendência é de considerá-los como sinantrópicos. E mais, são os únicos mamíferos que permanecem em áreas muito devastadas.

Popularmente bastante desconsiderados na atualidade, os didelfídeos, por suas peculiaridades, oferecem possibilidades únicas de estudos ecológicos, evolutivos e biológicos, sendo, portanto, um interessante modelo animal.

Quadro 1 – Principais marsupiais do Brasil com suas características, nomes populares e localização

FAMÍLIA DIDELPHIDAE					
Taxa	Bioma(s)	Peso (G)	Dieta	Locomoção	Nome(s) Vulgar(es)
Caluromys					
C. lanatus (Olfers, 1818)	Am, Ce, MA, Pa	356	FO	AR	cuíca-lanosa
C. philander (Linnaeus, 1758)	Am, Ce, MA, Pa	170	FO	AR	cuíca-lanosa
Caluromysiops					
C. irrupta Sanborn, 1951	Am	250	FO	AR	cuíca
Glironia					
G. venusta Thomas, 1912	Am	150	IO	AR	cuíca
Chironectes					
C. minimus (Zimmermann, 1780)	Am, Ce, MA, Pa	665	PS	SC	cuíca-d'água
Didelphis					
D. albiventris Lund, 1840	Am, Ca, Ce, Pa, Cs	1250	FO	SC	gambá, saruê
D. aurita Wied-Neuwied, 1826	MA	985	FO	SC	gambá, mucura
D. marsupialis Linnaeus, 1758	Am	1200	FO	SC	gambá, mucura
Gracilinanus					
G. agilis (Burmeister, 1854)	Ca, Ce, MA, Pa	30	IO	AR	catita, guaiquica
G. emiliae (Thomas, 1909)	Am	20	IO	AR	catita, guaiquica
G. microtarsus (Wagner, 1842)	MA	31	IO	AR	catita, guaiquica
Lutreolina					
L. crassicaudata (Desmarest, 1804)	Am, Ce, MA, Pa	537	PS	TE	cuíca
Marmosa					
M. lepida (Thomas, 1888)	Am	10	IO	SC	catita, guaiquica
M. murina (Linnaeus, 1758)	Am, Ce, MA, Pa	52	IO	SC	catita, guaiquica
Marmosops					
M. impavidus (Tschudi, 1844)	Am	41	IO	SC	cuíca
M. incanus (Lund, 1840)	MA	64	IO	SC	cuíca
M. noctivagus (Tschudi, 1845)	Am	60	IO	SC	cuíca
M. neblina (Gardner, 1989)	Am	41	IO	SC	cuíca
M. parvidens (Tate, 1931)	Am	21	IO	SC	cuíca
M. paulensis (Tate, 1931)	MA	42	IO	SC	cuíca
Metachirus					
M. nudicaudatus (Desmarest, 1817)	Am, Ce, MA, Pa	280	IO	TE	cuíca-de-quatro-olhos, jupati
Micoureus					
M. constantiae (Thomas, 1904)	Am, Pa	90	IO	AR	catita, guaiquica
M. demerarae (Thomas, 1905)	Am, Ca, Ce, MA, Pa	105	IO	AR	catita, cuíca
M. regina (Thomas, 1898)	Am	100	IO	AR	catita, cuíca

Quadro 1 – Principais marsupiais do Brasil com suas características, nomes populares e localização (continuação)

FAMÍLIA DIDELPHIDAE					
Taxa	Bioma(s)	Peso (G)	Dieta	Locomoção	Nome(s) Vulgar(es)
Monodelphis					
M. americana (Müller, 1776)	MA, Cs	29	IO	TE	cuíca-de-três-listras
M. brevicaudata (Erxleben, 1777)	Am, Pa	84	IO	TE	catita
M. dimidiata (Wagner, 1847)	MA, Cs	52	IO	TE	catita
M. domestica (Wagner, 1842)	Ca, Ce, Pa	67	IO	TE	catita
M. emiliae ('I'homas, 1912)	Am	60	IO	TE	catita
M. iheringi (Thomas, 1888)	MA, Cs		IO	TE	catita
M. kunsi (Pine, 1975)	Ce	20	IO	TE	catita
M. maraxina (Thomas, 1923)	Am		IO	TE	catita
M. rubida (Thomas, 1899)	CE, MA	45	IO	TE	catita
M. scalops (Thomas, 1888)	MA	74	IO	TE	catita
M. sorex (Hensel, 1872)	MA, Cs	48	IO	TE	catita
M. theresa (Thomas, 1921)	MA	25	IO	TE	catita
M. unistriata (Wagner, 1842)	MA	50	IO	TE	catita
Philander					
P. andersoni (Osgood, 1913)	Am	400	IO	SC	cuíca, mucura-de-quatro-olhos
P. mcilhennyi (Gardner & Patton, 1972)	Am	400	IO	SC	cuíca, mucura-de-quatro-olhos
P. opossum (Linnaeus, 1758)	Am, Ce, Pa	360	IO	SC	cuíca, mucura-de-quatro-olhos
P. frenata (Olfers, 1818)	MA, Cs	360	IO	SC	cuíca, mucura-de-quatro-olhos
Thylamys					
T. macrura (Olfers, 1818)	MA	54	IO	SC	cuíca
T. pusilla (Desmarest, 1804)	Ce	18	IO	SC	cuíca

Fonte: Ordem Didelphimorphia (Occasional Papers in Conservation Biology Conservation International & Fundação Biodiversitas occasional paper nº 4/1996).

Legenda:

FO= Frugívoro/Onívoro	MA= Mata Atlântica
IO=Insetívoro/Onívoro	Am= Amazônia
PS=Piscívoro	Ce= Cerrado
AR= Arborícola	Ca= Caatinga
SC=Escansorial	Pa= Pantanal
TE=Terrestre	Cs=Campos do Sul

Referências Bibliográficas

Austad, S. N. The adaptable opossum. *Scientific American,* 258:54-59, 1988.

Jurgelski, W. Jr. et al. The opossum (*Didelphis virginiana* Kerr) as a biomedical model. II Breeding the opossum in captivity: methods. *Laboratory Animal Science*, 24(2):412-425, 1974.

Reig, O. Teoria Del origin y desarollo dela fauna de mamíferos de América Del Sur *Monografia Natural*, 1:1-161, 1961.

Bibliografia

Block, M. IV The blood forming tissus and blood of newborn opossum (Didelphis marsupialis). *Ergebnisse Anatomische Entwicklugsgeshichte*, 37:237-366, 1964.

Bucher, J. E. & Fritz, H. I. Behavior and maintenance of the woolly opossum (Caluromys) in captivity. *Laboratory Animal Science*, 27(6):1007-1012, 1977.

De Scorza, C.; Herrera, L. & Urdaneta-Morales, S. Trypanosoma (Schizotryopanum) cruzi: Histopathology in mice infected with isolates from *Didelphis marsupialis* from the valley of Caracas. *Acta Cientifica Venezuelana*, 47(4):244-247, 1996.

Feldman, D. B. & Ross, P. W. Methods for obtaining neonates of Known age from the Virginia opossum (Didelphis marsupialis virginiana). *Laboratory Animal Science*, 25(4):437-439, 1975.

Harder, J. D. & Fleming, M. W. Husbandry of a small breeding colony of opossums (Didelphis virginiana). *Laboratory Animal Science*, 32(5):547-549, 1982.

Hartmann, C. G. The breeding season of opossum (*Didelphis virginiana*) and the rate of intrauterine and post natal development. *Journal of Morphology*, 46:143-215, 1928.

Hayes, T. G. Studies of a primitive mammalian spleen, the opossum (Didelphis virginiana). *Journal of Morphology*, 124:445-450, 1968.

Hope, P. J. et al. Feeding patterns of s. Ceassicaudata (Marsupialia: Dasyuridae): role of gender, photoperiod, and fat stores. *American Journal of Physiology*, 272(1 Pt 3):78-83, 1997.

Kilmon, J. A. Sr. High tolerance to snake venom by the virginia opossum, Didelphis virginiana. *Toxicon*, 14(4):337-340, 1976.

Mac Manus, J. J. Temoerature regulation in the opossum, Didelphis marsupialis virginiana. *Journal of Mammalalogy*, 50(3):550-558, 1969.

Mays, A. Jr. et al. Hemograms of laboratory-confined opossums (Didelphis virginiana). *Journal of American Veterinarian Medicine Association*, 153(7):800-802, 1968.

Sherwood, B. F. et al. The opossum Didelphis virginiana, as a laboratory animal. *Laboratory Animal Care*, 19(4):494-499, 1969.

Szabuniewicz, J. M. et al. The electrocardiogram of the Virginiana opossum (Didelphis virginiana). *Zentralblatt Veterinarmedizin*, 25(10):785-793, 1978.

Thomason, J. J. et al. A plastic cage for restrain of the opossum (Didelphis virginiana). *Laboratory Animal Science*, 36(5):547-549, 1986.

Trupin, G. L. Care and breeding of the gray, short-tailed opossum. *Laboratory Animal Science*, 41(2):96-99, 1991.

23

Criação e Manejo de Serpentes

Aníbal Rafael Melgarejo-Giménez

Introdução

Muito diferente do que ocorre com as espécies de mamíferos e de aves, tradicionalmente criados tanto para pesquisa laboratorial quanto para produção de peles, carnes e outros subprodutos, as serpentes ainda não têm o *status* de animais de laboratório ou de produção. Isso se deve, em parte, ao fato de terem sido consideradas tradicionalmente animais prejudiciais e foi a muito custo que se conseguiu evitar a sua matança, para que estas fossem levadas aos serpentários e utilizadas como fornecedoras de veneno.

A experiência do Brasil, nesse sentido, é pioneira, e remonta aos primeiros anos do século XX, no Instituto Butantan de São Paulo. Ali, desde sua fundação, em 1901, até 1977, foram recebidas cerca de 1,1 milhão de serpentes, 80% delas de espécies venenosas (Belluomini, 1984). Essa abundância impressionante, com uma média de quase 15 mil serpentes recebidas por ano, explica a demora no desenvolvimento de técnicas mais aprimoradas para sua reprodução e criação em cativeiro.

Passado um século desde aquelas experiências pioneiras, muitos aspectos mudaram significativamente e, na atualidade, manter um serpentário de produção de venenos significa ter de administrar um complexo conjunto de fatores éticos, biológicos, sanitários e tecnológicos, entre outros. Neste capítulo, serão abordados aspectos gerais de biologia e de identificação de serpentes, e aspectos específicos de estrutura, organização e rotinas de um serpentário.

Pelo fato de os venenos apresentarem uma razoável variação intra-específica, individual (Willemse, 1978), ontogenética (Gutiérrez et al., 1990) e geográfica (Glenn & Straight, 1978), e significativas diferenças entre as espécies, os laboratórios produtores de soros são exigidos a obter uma boa representatividade de venenos no *pool* de imunização dos eqüídeos para produção dos soros (OPS, 1977; WHO, 1981). Isso significa contar com serpentários que abriguem centenas de serpentes, pelo menos das principais espécies e provenientes de uma área geográfica o mais ampla possível. Em um país de dimensões continentais como o Brasil, isso representa um desafio singular, pois significa um esforço para a captura, o acondicionamento e o transporte seguros, o recebimento e a adaptação ao meio artificial no serpentário.

Torna-se necessário, antes de iniciarmos as considerações técnicas deste capítulo, esclarecer expressamente o entorno legal em que se inscreve esse assunto. As serpentes, como todos os animais da nossa fauna silvestre, encontram-se no Brasil protegidas por legislação específica (Lei nº 5.197, de 3 de janeiro de 1967). Sua captura e criação são apenas permitidas sob determinadas condições, que estão regulamentadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama).

A captura e o transporte para fins científicos só são permitidos por meio de licença específica (Portaria Ibama nº 332, de 13 março de 1990). Existem disposições para sua criação tanto em instituições científicas (Portaria Ibama nº 016, de 4 de março de 1994) como também em criadouros com finalidade comercial (Portaria Ibama nº 118-N, de 15 de outubro de 1997). Existe também a possibilidade de estabelecimento de criadouros de fauna silvestre exótica, como consta na Portaria Ibama nº 102/98, de 15 de julho de 1998.

Sendo as serpentes animais ectotérmicos (de temperatura corporal variável), a situação geográfica dos serpentários tem papel fundamental no sucesso da criação e manejo desses animais. Isso exige, por um lado, um certo grau de climatização dos criadouros, e, por outro, um conhecimento mínimo das condições ambientais básicas de cada espécie em particular. Torna-se, então, complexo o desafio dos serpentários que necessitam manter um considerável número de gêneros e espécies diferentes, como é o caso dos institutos produtores de soros.

Iniciaremos este capítulo abordando uma série de aspectos biológicos relevantes das serpentes, como algumas de suas características morfológicas, seus hábitos e referências básicas para sua identificação. Posteriormente, analisaremos os aspectos mais específicos, relativos aos tipos de serpentários, sua organização, funcionamento e os principais problemas que costumam aparecer para quem deve criar e manter serpentes em cativeiro.

Origem, Evolução e Grandes Grupos de Serpentes

As serpentes ou ofídios são popularmente conhecidos no Brasil como 'cobras'. Cientificamente, são agrupadas dentro da subordem Serpentes, que junto com Sáuria (lagartos e lagartixas) e Amphisbaenia ('cobras-de-duas-cabeças'), formam a ordem Squamata, o principal, mais numeroso e mais moderno grupo dos répteis viventes (Classe: Reptilia; subclasse: Diapsida; infraclasse: Lepidosauria). Foram descritas cerca de 3 mil espécies de lagartos, 130 de anfisbenídeos e aproximadamente 2.300 espécies de serpentes.

A origem desse grupo provavelmente remonta ao Período Cretáceo (há cerca de 125 milhões de anos) e o desenvolvimento da maior parte das serpentes deve ter ocorrido no Cenozóico. São, portanto, relativamente recentes, sobretudo levando-se em conta que os primeiros répteis datam de 260 milhões de anos atrás. Parece que surgiram de algum grupo de lagartos (animais mais antigos e aqueles com que têm maior semelhança) e admite-se que possam ter derivado de lagartos de vida subterrânea, que, por adaptação, apresentassem corpo extremamente alongado, redução das patas e olhos semi-atrofiados.

As serpentes são encontradas em quase todo o mundo, mas habitam principalmente as regiões temperadas e tropicais, em especial – em razão de sua dependência do calor externo –, para efetuar, por mecanismos comportamentais (e não metabólicos), sua termorregulação. Como os demais répteis, são animais ectotérmicos, diferenciando-se de aves e mamíferos (endotérmicos). As grandes famílias de serpentes ocuparam praticamente todos os ambientes disponíveis, desde os terrestres, subterrâneos e arbóreos, até as águas continentais e oceânicas, diversificando-se notavelmente para se adaptar a exigências tão díspares. Apesar de terem sofrido uma radiação adaptativa surpreendente, conservaram um padrão morfológico bastante homogêneo, mesmo que as menores espécies (*leptotyphlopidae*) possam ter apenas 10 cm de comprimento e as maiores (*boidae)* cheguem, eventualmente, a atingir um tamanho próximo aos 10 metros.

Características e Biologia das Serpentes

Além da forma extremamente alongada do corpo, da falta de membros locomotores, e da posse de escamas epidérmicas cobrindo todo o corpo, as serpentes são caracterizadas pela ausência de pálpebras móveis e de ouvido externo. Caracterizam-se também por apresentarem grande elasticidade nos movimentos cranianos, em

especial nas articulações das mandíbulas, unidas entre si apenas por um ligamento elástico, e com o crânio pelos ossos móveis quadrado e supratemporal. Nas vértebras, existem articulações adicionais, *zygosphena* e *zygantra*, que limitam a mobilidade entre uma vértebra e outra, diminuindo o ângulo articular, o que é compensado pelo alto número de vértebras (entre 180 e 400). No conjunto, a elasticidade e a flexibilidade dos movimentos necessários para a locomoção são preservadas e até aumentadas. Tais articulações se tornaram necessárias para garantir o suporte a uma coluna vertebral extremamente longa.

A pele é trocada periodicamente em um processo chamado de 'muda', que, geralmente, desprende-se inteira, começando pela borda dos lábios. Alguns dias antes da muda, as serpentes ficam com a pele esbranquiçada, pela interposição de líquido entre a velha e a nova camada epidérmica, e diminuem bastante a atividade, recolhendo-se a cantos tranqüilos. Logo depois da 'muda', ficam novamente muito ativas, com um aspecto renovado e cores mais vivas.

As escamas são córneas e apresentam alfa-queratina, enquanto os espaços entre elas, que devem ser muito elásticos, estão compostos por beta-queratina. Existem escamas de diversas formas, texturas e tamanhos, muitas vezes fruto de adaptação para funções específicas. Uma das mais notáveis adaptações é observada nas cascavéis, que apresentam um apêndice caudal – o chocalho – constituído por modificação de escamas, mas que também envolve a fusão das últimas vértebras caudais, formando uma peça única o estilo no qual se inserem os músculos que movimentam esse órgão. Os segmentos córneos do chocalho se articulam frouxamente entre si, por sua forma peculiar, e cada um representa uma porção remanescente da muda de pele.

A organização interna das serpentes, apesar do alongamento do corpo, detém um padrão semelhante ao dos outros répteis, com algumas modificações. No sistema circulatório, o coração não apresenta particularidades, mas existem diferenças como um maior número de vasos sangüíneos, para garantir uma boa irrigação orgânica. Nos órgãos pares aparecem algumas modificações; nos pulmões, enquanto o direito sofre uma hipertrofia, estendendo-se pelos dois terços iniciais do corpo, como um grande reservatório de ar, o esquerdo não existe na maioria das espécies, e nas que existe, está praticamente atrofiado. O intercâmbio gasoso realiza-se principalmente por meio de um pulmão traqueal e pela porção anterior do pulmão funcional. Os outros órgãos pares, como rins, supra-renais, testículos e ovários, além de alongados, têm uma disposição assimétrica: os do lado direito, na frente dos do lado esquerdo. O tubo digestivo caracteriza-se, sobretudo, por sua capacidade de distensão, que é muito grande no esôfago e estômago, e pela simplicidade do intestino, curto e sem dobras. O fígado, bem desenvolvido, é alongado, com a vesícula biliar separada, em posição posterior, junto ao pâncreas e baço, que são estruturas pequenas. O sistema excretor, sem bexiga, junto com o intestino e os órgãos genitais, desemboca numa cavidade comum, a cloaca, que se abre ao exterior numa fenda anal transversal. Os órgãos copuladores dos machos são pares, denominados de hemipênis, e encontram-se invaginados na cauda. São órgãos esponjosos que, para a ereção, enchem-se de sangue e linfa, e apresentam estruturas peculiares, como espinhos e outras macro e microornamentações, de reconhecida importância taxonômica.

Os órgãos sensoriais têm permitido às serpentes explorar de forma surpreendente as potencialidades dos ecossistemas de que fazem parte.

A visão apresenta diversos graus de desenvolvimento nos diferentes grupos, mas, em geral são míopes e a acomodação visual é ineficiente, estando esse sentido muito mais vinculado à detecção de movimentos do que de formas. Os olhos, sem pálpebras, estão protegidos por uma escama semelhante a uma lente de contato, a qual é trocada junto com a pele.

O olfato é bastante desenvolvido nesses animais, mas não está associado ao epitélio das fossas nasais, que parecem ser responsáveis principalmente pelo acondicionamento e condução do ar para a respiração. Os movimentos vibratórios da língua, fina, comprida e bifurcada, permitem à serpente fazer uma varredura de partículas do ar, que a extremidade se encarrega de conduzir para o órgão de Jacobson, um quimiorreceptor especializado, revestido por epitélio sensorial, o qual se abre por dois orifícios na mucosa bucal superior logo atrás da escama rostral.

A audição de sons transmitidos pelo ar praticamente inexiste, em virtude da falta de ouvido externo e médio. O ouvido interno está conectado ao osso quadrado, que se articula com a mandíbula por uma delicada estrutura óssea, a columela, o que confere às serpentes uma particular sensibilidade às vibrações do substrato.

A termorrecepção é uma adaptação presente em duas famílias de serpentes (Boidae e Viperidae), o que permite a esses animais uma maior facilidade na detecção, aproximação e captura do alimento, constituído de pequenas aves e mamíferos, emissores de radiação infravermelha. Os boídeos apresentam adaptações sensitivas nas escamas supra e infralabiais que, em alguns casos, formam fileiras de fossetas.

Os órgãos existentes nos Viperídeos, as 'fossetas loreais', características da subfamília Crotalinae, são importantes para uma rápida identificação das serpentes, que causam 99% dos acidentes no Brasil e em outros países da América Latina. A fosseta loreal localiza-se entre o olho e a narina, a cada lado do rosto. Cada fosseta consta de uma abertura estreita que se comunica com uma ampla câmara interna, dividida em dois compartimentos por uma membrana de 15 micra de espessura, o componente sensorial do órgão. As terminações nervosas são semelhantes aos receptores de calor da pele dos mamíferos, com a diferença de sensibilidade dada por dois fatores importantes. Em primeiro lugar, as terminações da pele do mamífero se encontram a uma profundidade de 300 micra, ao passo que, na fosseta, as mesmas estão a apenas duas micra da superfície. A segunda diferença é que a fosseta consegue concentrar toda a energia que incide sobre a membrana, pelo fato desta se encontrar estendida entre duas camadas de ar, evitando, assim, a perda de calor por difusão nos tecidos adjacentes, o que ocorre na pele. O resultado é que essas serpentes têm uma capacidade surpreendente para localizar seu alimento num amplo espectro de situações, tanto em pleno dia, ao crepúsculo ou na noite mais escura.

A reprodução envolve fenômenos biológicos muito interessantes, que vão desde peculiaridades no comportamento, como os combates ritualizados entre machos, até adaptações ecológicas, como os ciclos sexuais com periodicidades adaptadas a cada clima.

As serpentes podem botar ovos (as chamadas espécies ovíparas) ou parir filhotes prontos, como os mamíferos (espécies vivíparas). Em quase todas as famílias de serpentes existe um predomínio de uma ou outra modalidade, mas as espécies ovíparas são maioria. No que se refere a nossas espécies peçonhentas, são ovíparas as cobras corais (gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus*) e, um caso excepcional entre os Viperídeos, a 'surucucu' (*Lachesis muta*). Os demais Viperídeos, dos gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias* e *Crotalus*, são todos vivíparos. As espécies ovíparas fazem a postura em troncos ocos em decomposição, em tocas no chão, sob pedras ou em formigueiros de formigas cultivadoras, todos ambientes com alto teor de umidade e mínima variação de temperatura. Esses dois requisitos são fundamentais, em parte porque os ovos têm a casca apergaminhada (não calcificada), desidratam e contaminam com facilidade, e demoram entre 40 e 70 dias para eclodir. As serpentes vivíparas apresentam um período de gestação variável entre as diversas espécies, mas que, em nossos Viperídeos, está em torno dos 4 a 5 meses. Os filhotes das serpentes, seja qual for a forma de nascimento, são dotados de autonomia para sobreviver, o que significa que, nas espécies peçonhentas, já nascem com seus aparelhos secretor e inoculador de veneno funcionais.

Com referência à alimentação, podemos dizer que todas as serpentes são carnívoras e engolem o alimento inteiro, já que seus dentes agudos e recurvados não lhes permitem parti-lo.

Os dentes das serpentes não possuem raiz e encontram-se 'cimentados' em depressões superficiais dos ossos dentários. Como são agudos e delicados, costumam danificar-se, existindo um mecanismo pelo qual periodicamente são trocados por outros novos, que se formam em locais próximos aos de sua implantação. Essa renovação ocorre durante toda a vida da serpente.

O tipo de alimento, que inclui desde lesmas e outros moluscos gastrópodes, artrópodes (como insetos e miriápodes), peixes, anfíbios, répteis (inclusive outras serpentes), aves e mamíferos, e a estratégia de captura, que apresenta desde espécies constritoras até envenenadoras, variam muito dentro da subordem das serpentes (Amaral, 1927).

Evolução da Função Venenosa

Poderia parecer fácil distinguir as serpentes inofensivas, sem glândulas de veneno nem presas inoculadoras, daquelas espécies caracteristicamente peçonhentas, com um aparelho extremamente desenvolvido para produção e rápida injeção da peçonha. Entretanto, essa facilidade se observa apenas nessas duas situações que, na verdade, são os extremos de um processo evolutivo complexo e altamente especializado, o qual espera ainda respostas para muitas interrogações.

Múltiplos estudos da morfologia craniana e das dentições de espécies viventes têm tentado explicar como se operou esse processo evolutivo, que partiu das formas consideradas mais primitivas, não venenosas, para chegar aos estágios mais modernos, possuidores de glândulas venenosas com músculos compressores e presas com um canal interno fechado, que conduzem as secreções tóxicas até o interior dos tecidos das vítimas, produzindo morte rápida.

Tradicionalmente, são caracterizados quatro estágios evolutivos bem marcados nas serpentes, que representam com simplicidade o universo complexo de adaptações morfológicas da especialização peçonhenta, levando-se em conta principalmente a dentição (Fig. 1):

Áglifa (Fig. 1 A) – é a dentição que, como a etimologia do termo indica, não possui presas, dentes especializados na inoculação de saliva tóxica ou veneno. Nesse estágio, a glândula supralabial produz uma secreção destinada a lubrificar o alimento. Dentro dessa categoria distinguem-se variadas condições, como homodonte (com todos os dentes iguais) e heterodonte (com alguns dentes alongados).

Opistóglifa (Fig. 1 B) – dentição com um ou mais dentes modificados na parte posterior da maxila. Essas presas possuem sulcos longitudinais, dos quais, por capilaridade, escorre o produto de uma glândula especializada na secreção de substâncias ativas, a glândula de Duvernoy.

Proteróglifa (Fig. 1 C) – dentição em que presas anteriores, no maxilar, geralmente com canal de veneno não completamente fechado, estão conectadas à glândula venenosa. Alguns gêneros conservam dentes posteriores à presa, mas em *Micrurus* a presa é o único dente maxilar.

Solenóglifa (Fig. 1 D) – dentição com uma condição muito especializada em que um único dente funcional em cada maxila, a presa, é extremamente grande, agudo e oco, e permanece paralelo ao crânio quando em repouso, mas gira 90º, no momento do ataque, para injetar o veneno.

Espécies Peçonhentas da Fauna Brasileira

O Brasil tem uma riquíssima fauna de serpentes, composta por cerca de 265 espécies, classificadas dentro de aproximadamente 73 gêneros, reunidos em 9 famílias.

De todo esse elenco, vimos que apenas duas famílias (Elapidae e Viperidae) congregam as espécies que chamamos de peçonhentas, isto é, aquelas que produzem toxinas em glândulas especializadas e têm aparelhos apropriados para inoculá-las, ocasionando intoxicações sérias no homem e em animais domésticos. Esse conceito tem, para nós, um caráter pragmático, apenas para cumprir um objetivo prático dentro da área médica, pois é sabido que diversas espécies de colubrídeos (família Colubridae), habitualmente tratadas como 'não-peçonhentas', possuem glândulas cefálicas (em particular a glândula de Duvernoy) que fornecem substâncias químicas para ajudar na ingestão e digestão do alimento, e que podem, muitas vezes, ser tóxicas também para o ser humano.

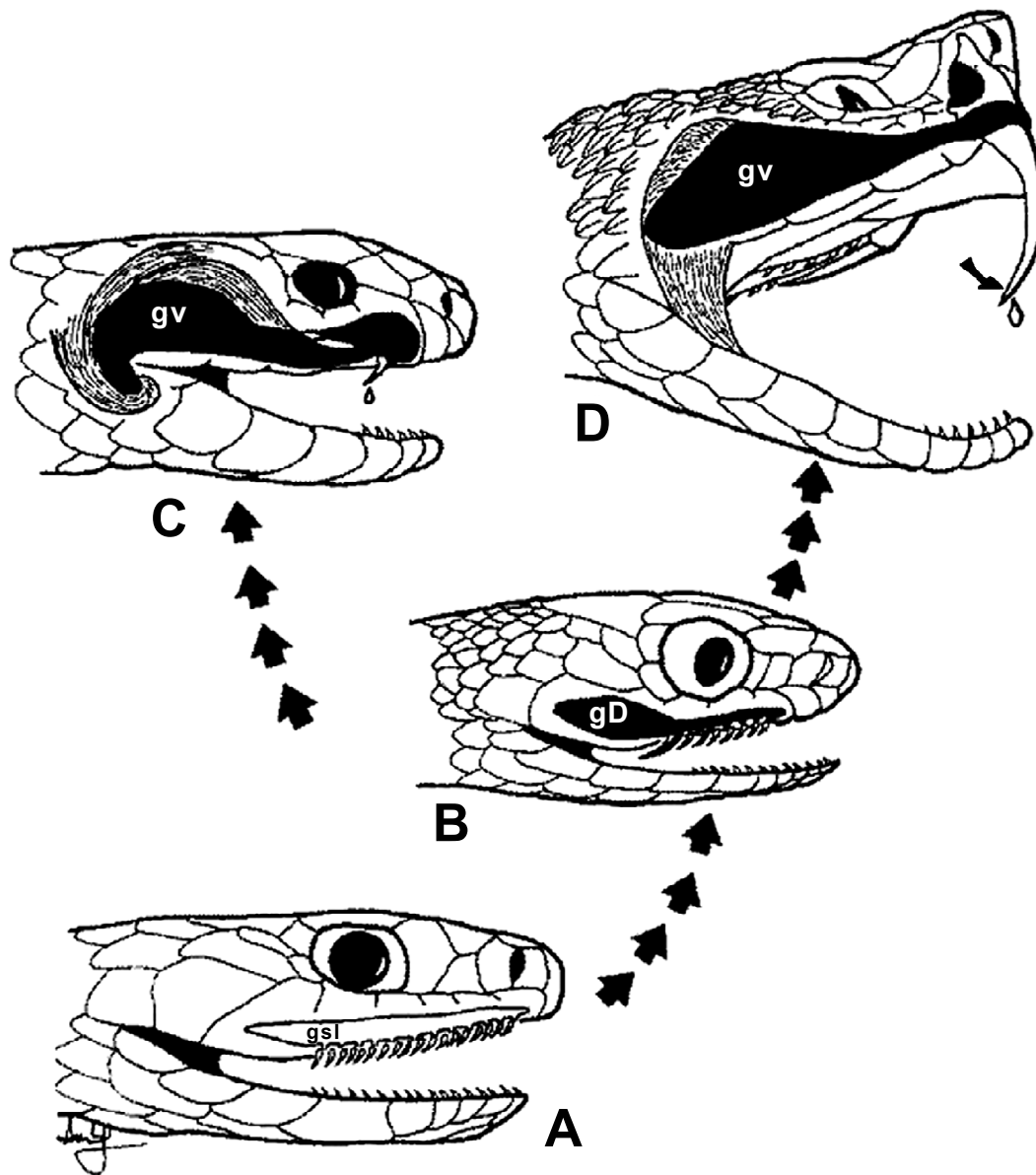
Figura 1 – Representação do provável processo de especialização peçonhenta das serpentes (A) dentição áglifa; (B) opistóglifa; (C) proteróglifa; (D) solenóglifa. gsl – glândula supralabial, gD – glândula de Duvernoy, gv – glândula venenosa

Fonte: adaptado de Kardong (1983).

Figura 2a – As *Micrurus*, como esta *M. corallinus*, têm o corpo com anéis completos de cor preta, vermelha e amarela ou branca

Figura 2b – A espécie mais típica do gênero *Bothrops* no Brasil é a jararaca, *B. jararaca*

Figura 2c – A surucucu, *Lachesis muta*, é a maior de nossas serpentes peçonhentas, com até mais de três metros de comprimento

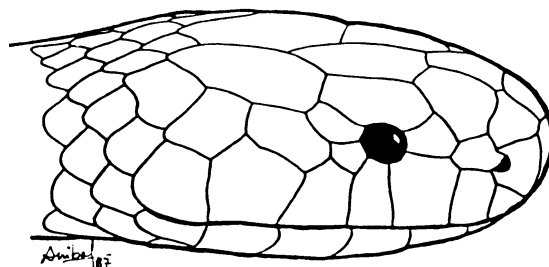
Figura 2d – A cascavel, *Crotalus durissus*, é inconfundível pelo chocalho na cauda

FAMÍLIA ELAPIDAE

A família Elapidae é composta, como já visto, por serpentes dotadas de um aparelho inoculador do tipo proteróglifo (Fig. 1c), e encontra-se amplamente distribuída pelo mundo, com aproximadamente 240 espécies. Muito bem conhecidos na Ásia, África, e particularmente diversificados na Austrália, os elapídeos contêm espécies famosas, como as 'najas' asiáticas e africanas, e as temidas 'mambas' do continente africano. Nas Américas, a família está representada pelas chamadas 'cobras corais', das quais, na fauna brasileira, são reconhecidas umas 25 a 30 espécies e subespécies, a maioria pertencendo ao gênero *Micrurus* (Fig. 2a) e apenas três ao gênero *Leptomicrurus* (Da Silva Jr., 1997; Roze, 1996).

Essas serpentes apresentam a cabeça oval, recoberta por grandes placas simétricas, não possuem fossetas loreais como nossos Viperídeos, e os olhos são pequenos e pretos, com pupila elíptica vertical (Fig. 3). O pescoço não é bem pronunciado, por causa do desenvolvimento da musculatura cervical, adaptada para a escavação, bem como os ossos cranianos, estes muito fortes. O corpo, cilíndrico, é recoberto por escamas lisas, e a cauda, curta e roliça, dá nome ao principal gênero, *Micrurus* (termo de origem grega que significa 'cauda pequena'). A maioria das espécies possui a coloração típica de 'cobra coral', com anéis completos em torno do corpo, de cores vivas e contrastantes – vermelho, amarelo (ou branco) e preto –, em arranjos característicos, com os anéis pretos dispostos isoladamente ou em tríades. Exceção a essa regra são as espécies de *Leptomicrurus*, de cor preta uniforme no dorso, sem anéis, e com manchas amareladas na região ventral. Da mesma forma, *Micrurus annellatus* não apresenta anéis vermelhos.

As corais são animais de hábitos fossoriais ou subfossoriais, habitando principalmente a camada superficial do solo, ou sob o colchão de folhas que cobre o chão das matas. Eventualmente, saem à superfície à procura do alimento, ou para acasalar, ou ainda depois de chuvas fortes. A alimentação geralmente é composta por pequenas serpentes e anfisbenídeos. São animais ovíparos. As fêmeas põem, geralmente, entre 2 e 10 ovos, em buracos no chão, formigueiro ou dentro de troncos em decomposição. Após um período de aproximadamente dois meses de incubação, conforme as condições ambientais, nascem os filhotes, medindo em torno de 17 cm de comprimento.

Figura 3 – Representação da cabeça de uma cobra coral, mostrando sua forma oval, recoberta por placas grandes e simétricas

A abertura bucal, conforme nossas medições, não ultrapassa um ângulo de 30º e repercute diretamente no tamanho das presas inoculadoras de veneno, que alcançam apenas um comprimento aproximado de 2,5 mm numa coral de 90 cm. A injeção de veneno é, portanto, superficial, o que é compensado por um fator agravante, já que as corais mordem e não soltam, de forma que o período de inoculação costuma ser prolongado. O conjunto de limitações anatômicas e funcionais, associado à pouca agressividade dessas serpentes, explica a baixíssima incidência de acidentes humanos por corais, em torno de 0,5%, de acordo com a estatística do Ministério da Saúde, restritos principalmente a pessoas que manipulam esses animais.

Uma característica saliente na biologia das cobras corais está associada com o colorido vivo e contrastante, aposemático, que certamente faz parte de um repertório de adaptações para a defesa, entre as quais o comportamento de bruscamente contorcer o corpo, escondendo a cabeça e levantando a cauda enrolada. Essas características também envolvem um complexo de espécies miméticas, sobretudo da família Colubridae, as chamadas 'falsas corais'.

Algumas espécies são extremamente raras e pouco conhecidas, às vezes confinadas a áreas geográficas muito restritas; outras, pelo contrário, são bem comuns, disseminadas por extensas áreas do território nacional e tradicionalmente reconhecidas; certamente são as mais importantes do ponto de vista da saúde pública.

FAMÍLIA VIPERIDAE

A família Viperidae, com cerca de 170 espécies distribuídas pelo mundo, é formada por serpentes com aparelho inoculador do tipo solenóglifo (Fig. 1 D), facilmente identificadas pela cabeça triangular, recoberta por pequenas escamas de aspecto similar às do corpo. Para caracterizar a subfamília Crotalinae, devemos somar a esses atributos a presença de fosseta loreal entre o olho e a narina (Fig. 4), como dito anteriormente.

Os Viperídeos compreendem, sem dúvida, o grupo de serpentes mais importantes para a saúde pública, pois são responsáveis pela enorme maioria dos acidentes ofídicos por serpentes peçonhentas registrados, não só no Brasil, mas também nos outros países das Américas. A fauna do Brasil inclui 5 gêneros que somam 23 espécies e, se contarmos as subespécies, o número chega a 39. A lista que apresentamos no final do capítulo tem como base os trabalhos clássicos utilizados como referências (Hoge & Romano, 1971; Hoge & Romano-Hoge, 1981) e inclui as recentes mudanças taxonômicas que afetaram, principalmente, o gênero *Bothrops* (Campbell & Lamar, 1989), com seu desdobramento em diversos gêneros, dos quais, no Brasil, estão representados *Bothriopsis* e *Porthidium*.

A identificação dos principais gêneros de Viperídeos pode ser feita com uma certa facilidade, utilizando caracteres morfológicos externos, somados aos já mencionados (cabeça triangular recoberta por escamas pequenas e presença de fosseta loreal).

As serpentes do gênero *Bothrops* (Fig. 2b) são caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares (Fig. 5A). O gênero *Lachesis* (Fig. 2c) apresenta a cauda com as últimas fileiras de subcaudais modificadas e eriçadas, terminando num espinho (Fig. 5 B). Finalmente, o gênero *Crotalus* (Fig. 2d) tem a cauda terminada em um apêndice articulado, o chocalho (Fig. 5 C).

CRIAÇÃO E MANEJO EM CATIVEIRO

Tanto por simples curiosidade, por uma finalidade didática de se mostrar esses animais em zoológicos e museus, ou pela necessidade de obtenção de seus venenos para pesquisa e produção de medicamentos, desde tempos imemoriais, mas em especial desde o fim do século XIX, começou-se a manter, reproduzir e criar serpentes. No início, de uma forma intuitiva e, posteriormente, de forma cada vez mais técnica, tentando reproduzir da melhor forma possível as condições ambientais necessárias, os serpentários vêm enfrentando o desafio de aprimorar a criação desses animais, possibilitando, cada vez mais, uma maior independência de sua captura nos ambientes naturais.

Grande número de pessoas no mundo, especialmente na Europa e nos Estados Unidos, criam serpentes como animais de estimação, em terrários, e há uma grande quantidade de manuais e revistas especializadas no assunto. Além disso, eleva-se o número de sociedades e lojas especializadas nos mais diversos países. Atualmente, a Internet revela inúmeras páginas que tratam da criação de répteis como mascotes (*pets*). Zoológicos e museus, incumbidos por seus fins didáticos, sempre expõem serpentes como uma de suas principais atrações.

Embora todo esse universo seja fascinante, representa uma realidade muito diferente do que particularmente nos interessa aqui abordar, ou seja, a criação e manutenção de serpentes peçonhentas para produção de venenos. Contrastando com a realidade acima citada, apenas um reduzido número de autores tem abordado cientificamente a montagem de serpentários para produção de venenos (Belluomini & Kemenes, 1967; Ashley & Burchfield, 1968; Leloup, 1973, 1975, 1984; Getreyer, 1985). A manutenção de centenas ou até de milhares de serpentes peçonhentas envolve uma estrutura e funcionamento razoavelmente complexos e diferenciados, pessoal altamente qualificado e programas permanentes de vigilância, revisão e aperfeiçoamento do sistema. Muito diferente, portanto, da criação de uns poucos animais de exposição ou de estimação.

O primeiro serpentário, com essa finalidade específica, foi provavelmente iniciado com o Instituto Butantan, em São Paulo, em 1901, pela necessidade de se obter venenos para a produção dos primeiros soros antipeçonhentos das Américas. No começo, as serpentes eram mantidas em compartimentos de alvenaria com tampas na parte de cima (Brazil, 1905) (Fig. 6).

Figura 4 – Cabeça de Viperídeo crotalíneo, mostrando as escamas pequenas, semelhantes às do corpo, e a presença da fosseta loreal, entre o olho e a narina

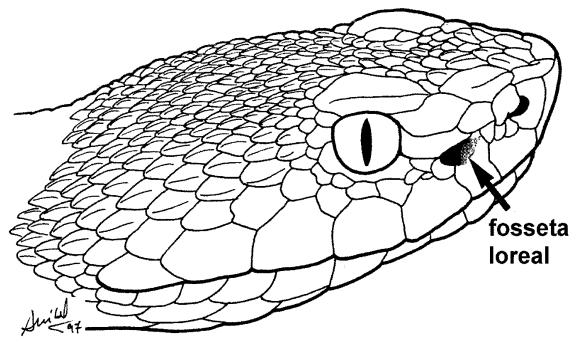



Figura 5 – Região caudal dos principais gêneros de Viperidae, mostrando: (A) cauda de *Bothrops* (vista ventral, com subcaudais duplas, normais); (B) cauda de *Lachesis* (mostrando as últimas fileiras de subcaudais quilhadas e eriçadas, e o espinho terminal); (C) cauda de *Crotalus*, mostrando o apêndice apical, o chocalho

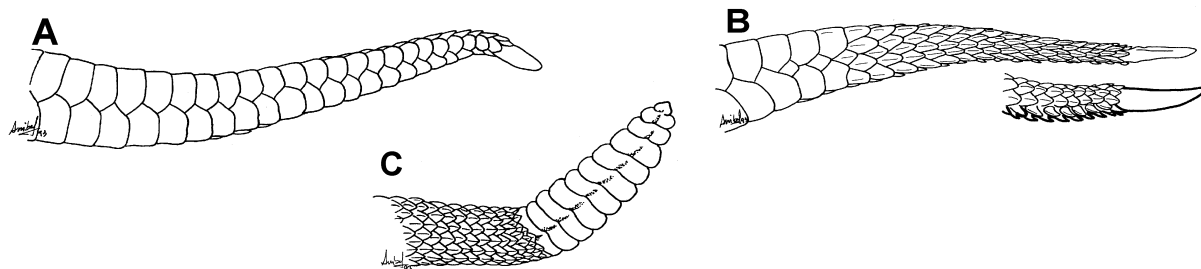
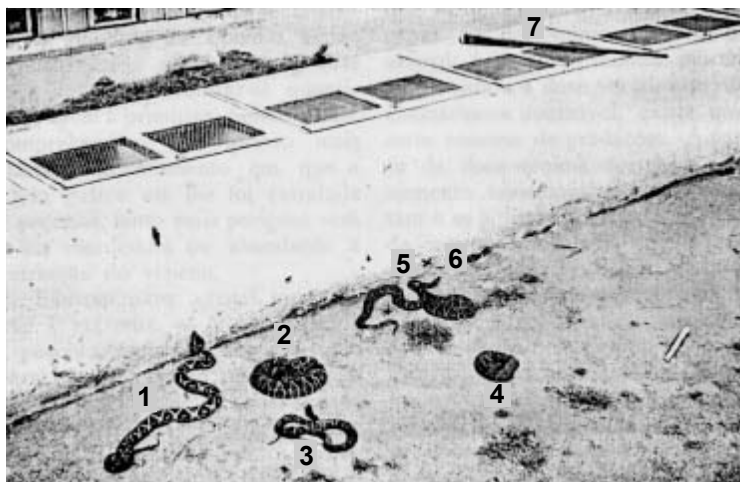



Figura 6 – Primeiro serpentário do Instituto Butantan

Fonte: Brazil (1905). Numeradas de 1 a 6, diversas espécies de serpentes; ao fundo, sobre as caixas de serpentes, o laço, 7.

Posteriormente, em 1911, foi construído talvez o mais famoso serpentário, idealizado por Vital Brazil, que tentou recriar nele as condições ecológicas do hábitat das serpentes para que elas sofressem menos no cativeiro. Ali encontravam água, espaços abertos para insolação, além de sombra e proteção nos 'cupinzeiros', num parque de cerca de 500 m² (Fig. 7). Além das extrações de veneno, o serpentário servia também para demonstrações diversas sobre o manuseio das cobras e a prevenção de acidentes, o que até os dias de hoje torna a Instituição um ponto de visitação turística clássico da cidade de São Paulo. Apesar do capricho na sua concepção, esse serpentário não propiciava às serpentes uma boa sobrevivência.

Assim, a partir de janeiro de 1963 a maior parte das serpentes do Instituto Butantan foram transferidas para um biotério experimental aquecido, onde as mesmas eram mantidas sob observação, tanto em gaiolas de madeira (de 58 x 40 x 30 cm) com frente telada, quanto soltas nas salas (Belluomini, 1964; Belluomini & Kemenes, 1967). Esse trabalho pioneiro permitiu verificar uma sensível melhoria tanto para a sobrevivência das serpentes quanto para a produção de venenos.

Figura 7 – Serpentário do Instituto Butantan, o famoso "jardim das serpentes"

Fonte: Brazil (1914).

Podemos dizer, portanto, que são possíveis dois tipos principais de serpentários, um semi-extensivo, onde os ofídios são mantidos em parques coletivos, manejados em áreas abertas limitadas, e um intensivo, onde os animais ficam confinados em caixas individuais. Ambos os tipos apresentam vantagens e desvantagens, e a opção por um ou outro dependerá de diversos fatores relacionados aos objetivos da criação, sua localização geográfica, dentre outros.

Serpentário Semi-Extensivo

Embora, como se procurou demonstrar, o parque aberto do Butantan apresentasse altos níveis de mortalidade das serpentes, esse tipo de serpentário é e pode ser utilizado com sucesso em determinadas circunstâncias. Tal é o que se demonstra, por exemplo, na Pentapharma do Brasil, serpentário mantido no município de Uberlândia, Minas Gerais, conforme mostrou Leloup (1984).

O autor descreve esse serpentário, que mantém grupos de criação apenas da espécie *Bothrops moojeni* em parques de 40 m², em terreno levemente inclinado, com água, amplo gramado e área de insolação, além de um

esconderijo subterrâneo com abertura também para uma sala onde se faz parte do manejo. A construção desses parques baseou-se em extenso trabalho de campo sobre a ecologia da espécie, determinando suas necessidades básicas, as quais foram otimizadas no modelo.

Desvantagens desse tipo de manutenção são apontadas pelo autor e estão relacionadas com o clima, que deve ser o mesmo ou muito semelhante com aquele nativo das serpentes a serem criadas, e isto envolve também a acessibilidade da área, a existência de um centro hospitalar próximo (para o caso de ocorrerem acidentes), de água potável, energia elétrica e comunicações, além de características geológicas do terreno que permitam a instalação – como sua inclinação, a permeabilidade do solo etc. Outras desvantagens existentes são a necessidade de um grande terreno, a dificuldade criada para garantir uma alimentação racionalmente distribuída entre as serpentes e a impossibilidade de estabelecer a origem dos filhotes encontrados nos parques.

As vantagens, contudo, estão representadas pelos amplos espaços que permitem às cobras se movimentarem entre a fonte de água, num extremo, e os abrigos, no outro, aproveitando ao máximo elementos naturais como banhos de sol, chuvas e ventos. É possível, assim, efetuar uma autotermorregulação, o que é muito importante para as serpentes. A convivência em grupos densos é benéfica, mas requer vigilância especialmente por rivalidade alimentar ou durante o período de acasalamento.

Esse tipo de serpentário, então, é apropriado para estabelecer o manejo de monoculturas de serpentes por períodos longos, quando se dispõe de uma área extensa, situada dentro da distribuição da espécie em questão, da qual se deva obter grandes quantidades de veneno de qualidade homogênea.

Serpentário Intensivo

A maior parte dos serpentários, entretanto, realizam manejo intensivo, pois devem criar um variado número de espécies, provenientes de diversos climas, em uma área bastante reduzida. Esse tipo de serpentário proporciona uma forma simples de manutenção, com facilidade para a vigilância dos animais, em relação à alimentação e reprodução, e para o controle dos fatores ambientais como temperatura e umidade.

Esse sistema também apresenta desvantagens, como a impossibilidade das serpentes realizarem termorregulação apropriada, obrigando a uma climatização em parâmetros que nem sempre são adequados para todos os espécimes. O espaço reduzido causa, ao longo dos anos, uma certa atrofia muscular por falta de exercício, o que muitas vezes leva as serpentes à obesidade. A falta de contato com elementos naturais não permite um perfeito equilíbrio fisiológico das serpentes. Isso se torna evidente pela facilidade com que os animais adoecem; e é particularmente arriscado por facilitar o surgimento de enfermidades contagiosas que, às vezes, são difíceis de controlar.

A descrição da estrutura e funcionamento desse tipo de serpentário tem como base nossa experiência no Instituto Vital Brazil (IVB), em Niterói, estado do Rio de Janeiro. Desde sua fundação, em 1919, o Instituto vem mantendo animais peçonhentos em cativeiro para pesquisas biológicas e produção de imunobiológicos e outros medicamentos.

Atualmente, são mantidas na Divisão de Animais Peçonhentos aproximadamente 300 serpentes e centenas de aranhas e escorpiões, a fim de, além de obter os venenos que servirão de antígenos na produção de soros, estudar, entre outros assuntos, a ecologia, a biologia reprodutiva e alimentar, a distribuição geográfica, o manejo e controle, a epidemiologia e os aspectos bioquímicos, imunológicos e farmacológicos dos venenos de algumas das espécies que consideramos mais significativas.

O prédio, de forma circular, ocupa uma área construída de aproximadamente 150 m^2, divididos em uma sala de recepção, uma sala de apoio e quarentena, três salas de criação e manutenção de serpentes (uma delas com sistema de climatização central), uma sala de criação de artrópodes e um laboratório de pesquisas e processamento de venenos.

Recursos Humanos e Segurança no Serpentário

Somente pessoas bem treinadas devem realizar o trabalho de um serpentário. É fundamental promover a familiarização dos técnicos e profissionais da equipe com os comportamentos e as necessidades básicas das serpentes, evitando assim atitudes que produzam reações agressivas ou defensivas que ponham em risco o bom andamento dos trabalhos. É essencial que se estabeleçam rotinas de trabalho a serem rigorosamente seguidas, havendo, a nosso ver, tendência, depois do período de treinamento básico, ao descuido ou relaxamento dos procedimentos em conseqüência de um excesso de confiança no trabalho realizado de forma freqüente. Isso deve ser especialmente evitado, insistindo-se na necessidade da atividade padronizada e do trabalho de equipe para a prevenção de acidentes.

As recomendações a seguir podem contribuir para o estabelecimento de bons hábitos das equipes, sobretudo para realizar tarefas que envolvam manipulação dos animais e das caixas:

- deve-se realizar atividades de manuseio, quando estritamente necessário, devidamente planejadas, com reserva de dias e horários para a realização das tarefas de maior risco, pois essas atividades exigem sempre extrema atenção e bons reflexos;
- deve-se promover o aprimoramento dos hábitos higiênicos e indicar o uso de equipamentos de proteção individual, como luvas de borracha ou cirúrgicas, máscaras e outros, uma vez que diversos agentes infecciosos e parasitários podem ser transmitidos das serpentes ao homem, principalmente por meio das fezes (Belluomini, 1984);
- é importante evitar o uso de relógios, pulseiras e outros elementos da indumentária pessoal que possam vir a se enganchar nas caixas ou prateleiras, aumentando o risco de acidentes;
- não se deve permitir a presença de estranhos no local, tendo em vista que representam elemento de distração;
- levar sempre em conta o comportamento das serpentes, em especial a distância que podem atingir no bote, que varia com os gêneros e espécies, sendo cerca de 30% do comprimento corporal em *Crotalus*, cerca de 50% em *Bothrops* e superior a este percentual em *Lachesis*;
- para o caso de ocorrência de acidentes, envolvendo ou não envenenamento, todos os membros da equipe devem saber como se conduzir de forma rápida e precisa. Isso inclui a suspensão imediata da atividade, a identificação do animal agressor e o encaminhamento urgente do acidentado ao centro de saúde apropriado.

A segurança contra fuga de animais e ocorrência de acidentes de trabalho é garantida pelo conjunto de barreiras físicas e procedimentos que envolvem o desenho de caixas e tampas, estantes, sistemas de vedação de portas e demais aberturas; a padronização dos instrumentos de trabalho e dos equipamentos de proteção individuais (EPIs) e o rigoroso treinamento dos membros da equipe do serpentário.

Caso existam no local os soros apropriados, instrumentos, produtos e fármacos de primeiros socorros, devem ser verificados regularmente o estado e os prazos de validade dos mesmos.

Embora as portarias do Ibama recomendem a posse de soros apropriados em caso de manutenção de espécies peçonhentas nos criadouros, preferencialmente, os mesmos devem ser aplicados em centros hospitalares e sob supervisão médica, dada a ocorrência de reações adversas muitas vezes graves, que podem exigir a imediata intervenção do profissional habilitado.

Nunca devem ser realizados preventivamente testes de sensibilidade ao soro nos membros da equipe, já que os próprios testes podem sensibilizar e induzir à reação alérgica.

Ambiente e Distribuição dos Espaços

Salas

A sala de um serpentário deverá ter algumas características indispensáveis para permitir tanto o conforto dos animais quanto a segurança e o conforto da equipe de tratadores. A área física ideal depende do tipo de caixas e do número de animais a serem criados.

Nossas salas (Fig. 8) têm cerca de 20 m^2, piso não poroso e sem rodapés, portas com visor e fechamento com boa vedação. Uma boa iluminação ambiental é essencial. Estantes laváveis e com o mínimo de dobras ou frestas, preferivelmente com rodízios – desde que não alterada sua estabilidade – para permitir seu deslocamento e uma melhor limpeza e desinfecção das mesmas e das paredes.

O número de caixas por sala deve ser limitado, tentando assim evitar doenças transmissíveis com perda de muitos animais. Leloup (1973) aconselha não ultrapassar o número de 50 serpentes por sala. Nosso serpentário pode comportar normalmente entre 80 e 100 serpentes por sala. A acomodação das caixas nas prateleiras deve permitir um manuseio confortável, evitando, se possível, ultrapassar a altura dos membros da equipe; e a primeira fileira deve ter um vão considerável acima do piso. O ideal seriam três ou quatro fileiras horizontais de caixas, dependendo do tamanho das mesmas.

A temperatura ambiente geralmente deve oscilar entre 25 ºC e 28 ºC. Algumas espécies ou circunstâncias que requeiram condições especiais podem ser atendidas na própria caixa, graças à existência de diversos tipos de aquecedores no mercado (de cerâmica, pedra aquecedora, placa, cabo, lâmpadas especiais).

A umidade ambiente depende da necessidade de cada espécie. Algumas, como as do gênero *Crotalus*, preferem ambientes secos, e as do gênero *Bothrops*, ao contrário, podem requerer ambientes com mais de 90% de umidade. Pode-se preconizar uma umidade confortável para o trabalho (cerca de 60%) e promover, dentro das caixas de manutenção, um aumento da mesma por meio de recipientes de água porosos, como os potes de barro.

Figura 8 – Vista parcial de uma sala de manutenção intensiva de serpentes, observando-se caixas de polipropileno, grandes abaixo e médias acima. A caixa aberta pelo operador alberga uma serpente

Fonte: serpentário do Instituto Vital Brazil.

A iluminação nas salas deve ser adequada às atividades da equipe de tratadores. Dado que a maioria das espécies peçonhentas é noturna, deve ser, sempre que possível, respeitado o 'fotoperíodo' natural, desligando a iluminação à noite. Estados especiais, como a prenhez em espécies vivíparas, podem necessitar de cuidado particular. Existem no mercado atualmente diversos tipos especiais de iluminação artificial, como lâmpadas fluorescentes e incandescentes.

Caixas

Uma caixa para manutenção de serpentes deve reunir uma série de condições gerais, independente de peculiaridades, tais como o tipo e o tamanho da serpente a ser mantida.

Em primeiro lugar, estão as características referentes a sua 'confiabilidade', no sentido de ter uma construção sólida, em material resistente (inclusive a eventuais quedas), com acesso amplo, sistema de fechamento fácil e vedação total, além de um travamento seguro.

A caixa deve, dentro do possível, possuir um visor para permitir uma fácil e rápida vistoria diária, além de se observar o posicionamento e atitudes da serpente antes de sua abertura para atividades de rotina e manuseio. Se possível, deve-se evitar o uso de vidro, pois este, quando quebrado, pode ferir tanto o tratador quanto a serpente, e também facilitar a fuga da mesma.

Em segundo lugar, a caixa deve ser 'prática' no manejo – leve, sem bordas cortantes ou quinas acentuadas, e com algum sistema de alça que facilite o uso –, além da necessária estabilidade e acomodação nas prateleiras ou suportes da sala. Finalmente, deve ser 'higiênica', permitindo limpeza e desinfecção rotineiras e ser dotada de um bom sistema de ventilação.

Figura 9 – Vista de caixa de manutenção de polipropileno com tampa de aço inox e acrílico, na qual se observa a ficha de identificação do animal e, no interior, a 'cama' de papelão ondulado e a serpente enrodilhada

Fonte: serpentário do Instituto Vital Brazil.

Com referência aos materiais, no Brasil – leia-se Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil (IVB) e Fundação Ezequiel Dias (Funeb) –, tradicionalmente foram usadas caixas de madeira em diversos modelos e tamanhos, com pelo menos um visor frontal de tela, vidro ou acrílico.

Outros serpentários utilizaram caixas de acrílico abertas acima, com tampa de grade metálica (Centro de Zoologia Aplicada, Córdoba, Argentina) ou caixas de fibrocimento com armação metálica (Instituto Clodomiro Picado, San José, Costa Rica).

Atualmente, no Brasil, os serpentários inicialmente mencionados têm adotado caixas de acrílico especialmente desenvolvidas (Butantan, Funed) ou caixas de polipropileno, originalmente desenhadas para roedores (camundongos, ratos, cobaias) com sistemas de tampas adaptados (IVB) (Fig. 9).

Em zoológicos, como o de São Paulo, é freqüente a utilização de caixas de fibra de vidro com frente de acrílico, próprias para exposição. Contudo, ainda são usadas caixas de madeira em situações especiais. Embora nas caixas de madeira a higiene e desinfecção estejam bastante comprometidas, por sua porosidade e por se tratar de matéria orgânica que se decompõe com a umidade, as serpentes se adaptam muito bem a esse material, já que é comum encontrá-las, na natureza, dentro de buracos e troncos.

Com referência aos tamanhos, geralmente são utilizados três ou quatro tamanhos de caixas, dependendo do porte e tipo de serpente que será mantida. Caixas pequenas (aproximadamente 30 x 20 x 12 cm – fundo x largura x altura) são apropriadas para filhotes em geral e espécies de pequeno porte, como as corais (*Micrurus* sp) e pequenas jararacas (*Bothrops neuwiedi*, *B. erythromelas*, *B. itapetiningae* e *B. bilineatus*).

As caixas para corais devem ser especialmente desenhadas, pois essas serpentes possuem especial habilidade para fugir por qualquer fresta. As caixas médias (aproximadamente 50 x 35 x 16 cm) representam a maioria em nosso serpentário e albergam os adultos da maior parte das espécies mantidas (gêneros *Bothrops* e *Crotalus*). Caixas grandes (aproximadamente 60 x 45 x 24 cm) são úteis para algumas espécies de porte mais avantajado, como jararacuçus (*B. jararacussu*), caiçacas (*B. moojeni*), surucucus (*Lachesis muta*) e grandes cascavéis (*Crotalus durissus cascavella*).

Caixas de tamanhos especiais (1 metro ou mais) podem ser necessárias para acasalamento ou procedimentos específicos, como estudo de comportamento ou filmagens. Existem no mercado diversos tipos de recipientes, de materiais variados (plásticos, em grande parte), que podem ser adaptados para as necessidades de manutenção e experimentação com serpentes. Deve-se procurar materiais de cores apropriadas, as quais evitem o estresse dos animais e permitam certa visualização por parte dos tratadores. As tampas ou as próprias caixas devem contar com um sistema de ventilação eficiente, geralmente mediante o uso de telas apropriadas (evitar as metálicas, que enferrujam e acabam machucando os animais) ou furos de um diâmetro apropriado para evitar a fuga, especialmente de filhotes.

Água

Alguns autores recomendam manter permanentemente um recipiente com água limpa em cada caixa (Organización Panamericana de la Salud, 1977). Entretanto, dependendo da espécie, isso não é necessário, já que, em geral, as serpentes bebem muito pouca água, eventualmente derrubando os bebedouros e encharcando a caixa, que acaba se tornando imprópria para a permanência do animal.

A permanência do recipiente com água (principalmente se é poroso, como os de barro) pode ajudar nas mudas de pele, não só pela umidade, como pelo fato de representar um substrato rígido e rugoso para o animal se esfregar nesse processo. Também ocorre de as serpentes eventualmente entrarem no recipiente da água, o que as auxilia, livrando-as de alguns ectoparasitos, como os ácaros.

Substrato

Um substrato apropriado forrando o piso da caixa é muito importante para o conforto do animal. No nosso serpentário utilizamos papelão ondulado, para evitar o apoio de todo o ventre do animal sobre a 'cama'. Outros serpentários utilizam substratos diversos, como maravalha ou papel de jornal. Um refúgio, que pode ser um tijolo oco, um vaso de planta furado e invertido, um tronco oco ou um canudo de papel,

dará conforto ao animal e evitará estresse excessivo. Isso é fundamental para algumas serpentes como as corais, e para filhotes em geral.

Instrumental

Laço de lutz – é muito conhecido o primeiro instrumento confeccionado no Brasil para captura de serpentes, assim chamado em homenagem ao seu inventor, o cientista Adolfo Lutz. Na época da invenção (fim do século XIX), o então diretor do Instituto Bacteriológico de São Paulo, com quem Vital Brazil trabalhava, idealizou-o para capturar e conter a serpente para a extração de veneno.

O Instituto Butantan oferece até hoje esses instrumentos para seus fornecedores de serpentes. Trata-se de uma peça de madeira em cujo extremo se fixa uma tira de couro, de uns 50 cm de comprimento, que forma o laço ao passar por anel de metal fixado também na extremidade, e preso por seu extremo livre a uma corda fina para 'puxar' e, assim, capturar a serpente (Fig. 10). Esse sistema é seguro, mas no laboratório é pouco prático, prestando-se mais ao trabalho de campo por leigos. Existem fabricantes nacionais de laços de alumínio e cabos de aço revestido de plástico flexível.

Figura 10 – Laço de Lutz. (a) instrumento pronto para a captura; (b) a serpente é presa um pouco atrás da cabeça

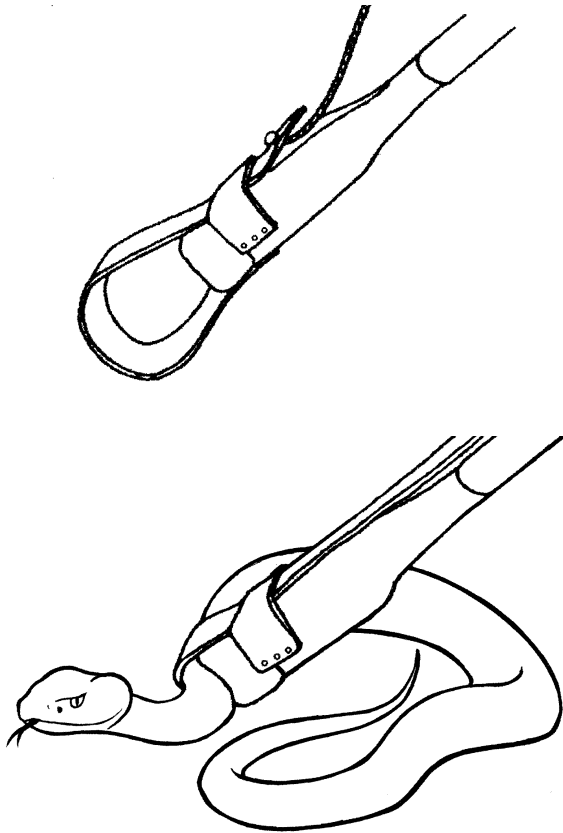
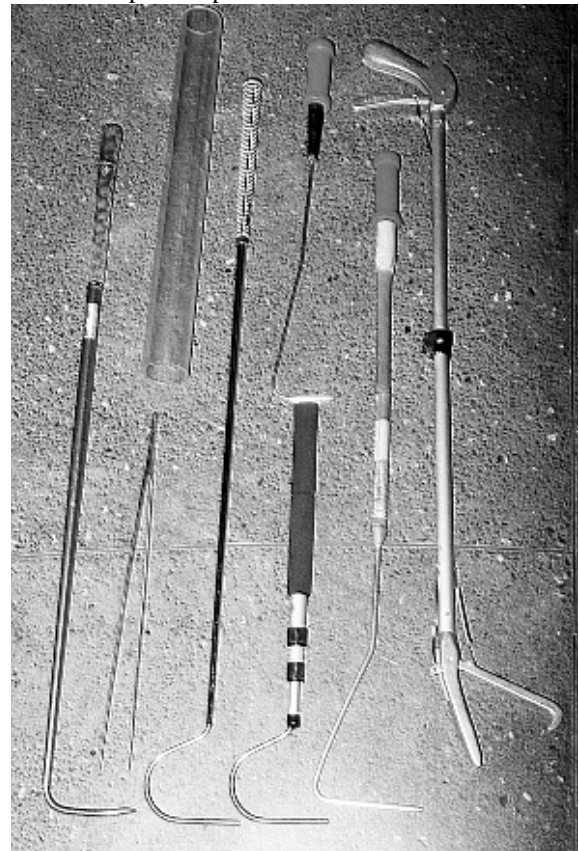



Figura 11 – Diversos instrumentos para contenção e captura de serpentes, utilizados no serpentário do IVB. (a), (d), (e), (f), (g): ganchos de diversos tamanhos e utilidades; (b): tubo de acrílico para contenção segura de serpente; (c): pinça longa de aço; (h): garra para captura

Fonte: serpentário do Instituto Vital Brazil.

Ganchos – o manuseio normal das serpentes requer o uso de ganchos (Figs. 11 a, d, e, f, g), instrumentos também de uso tradicional. Eles permitem levantar e transportar a serpente ou imobilizá-la com muita praticidade. Os ganchos podem ser confeccionados com certa facilidade, utilizando como haste um cabo de vassoura ou de bambu, ao qual se fixa numa extremidade um gancho metálico em 'L'. Este pode ser de alumínio, aço ou ferro. O comprimento deve ser apropriado para o tamanho da serpente e o conforto do operador, e deve estar de acordo com a área disponível na sala.

Ganchos muito compridos (mais de 1 m) podem atrapalhar o serviço em um local apertado, ao passo que um gancho muito curto pode expor o tratador a acidente. Para a maior parte dos serviços, um gancho de 60 cm a 90 cm é suficiente. É muito importante lembrar que esse instrumento representa a defesa do tratador, e, portanto, deve ser construído com materiais resistentes e leves para ser confiável. A fixação da parte metálica à haste deve ser muito segura e firme.

Nos Estados Unidos, existem fabricantes de ganchos de alta qualidade e confiabilidade, geralmente construídos com tacos de golfe, em fibra de carbono ou titânio. Alguns importadores e lojas especializadas no Brasil já dispõem desses produtos, embora a um custo bastante elevado.

Garras (Fig. 11 h) – geralmente construídas em alumínio, são um sistema mecânico muito útil para imobilização de serpentes, em especial as grandes. Seu uso requer certa habilidade e treinamento, pois às vezes o animal pode se debater ao ser capturado, e isto pode machucá-lo.

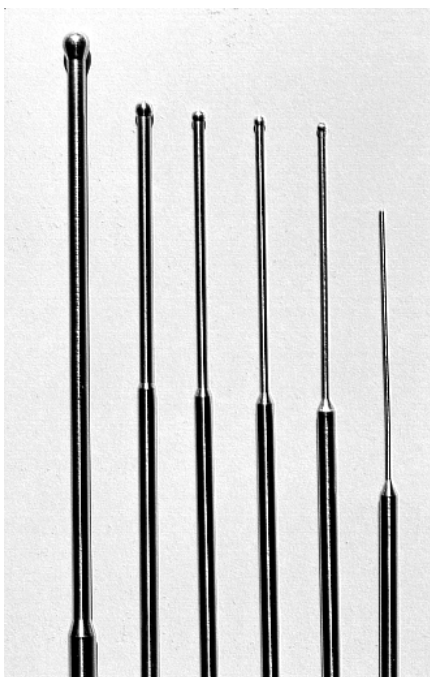
Tubos de plástico transparente (Fig. 11 b; Fig. 12) – feitos de diversos diâmetros e comprimentos podem ser utilizados para conter as serpentes, fazendo-as introduzir a cabeça e o pescoço por uma extremidade, evitando assim uma contenção mais traumática ao animal e conferindo segurança total ao tratador.

Figura 12 – Utilização de um tubo transparente de acrílico para conter um grande exemplar de serpente. O animal sofre muito menos estresse e traumatismo, e o operador tem absoluta segurança

Fonte: serpentário do Instituto Vital Brazil.

Pinças anatômicas de aço inox, de ponta romba (Fig. 11 c) – de diversos tamanhos, são úteis para abrir a boca das serpentes, expor as presas venenosas, fazer curativos e eventualmente até para introduzir alimentação forçada. As maiores, de 60 cm, permitem (dependendo da habilidade do tratador) até capturar com segurança pequenas serpentes.

Sexadores – são estiletes de aço inox e ponta romba (Fig. 13). Pelo fato de os hemipênis das serpentes serem ocos e estarem invaginados na cauda, com acesso pela parte posterior e lateral da fenda anal, a intromissão dos estiletes é possível apenas nos machos, o que representa uma forma segura e pouco traumática de se averiguar o sexo, até em filhotes. São fabricados e comercializados nos Estados Unidos.

Figura 13 – Sexadores para serpentes. O jogo permite o uso numa ampla gama de tamanhos, desde filhotes a grandes serpentes

Fonte: serpentário do Instituto Vital Brazil.

Luvas cirúrgicas – são úteis para usar durante a contenção, extração de veneno e procedimentos que envolvam o manuseio de serpentes, pois ajudam a evitar o contágio de eventuais doenças das serpentes (principalmente parasitárias) ao mesmo tempo que preservam bastante o tato e a sensibilidade manual do tratador, importantes nos momentos de contenção e soltura dos animais.

Óculos e máscaras faciais – podem ser instrumentos importantes na prevenção de respingos de veneno nos olhos durante o manuseio, a extração, ou a inalação de veneno já liofilizado, por ocasião do seu processamento ou pesagem.

Sistemas de Identificação de Serpentes

Como muitos outros animais, as serpentes apresentam uma individualidade que permite muitas vezes a sua identificação por marcas naturais. Sazima (1988) utilizou um sistema de identificação de *Bothrops jararaca* por suas manchas dorsais em estudos de campo. A técnica envolve o registro fotográfico das serpentes e dentro

de certos limites é razoavelmente prática, segundo pudemos verificar no início dos anos 90 em nosso serpentário. Por serem animais cobertos por escamas epidérmicas, de forma e distribuição bastante constantes para cada espécie, algum sistema de marcação tipo tatuagem individual pode ser aplicada às serpentes. Tradicionalmente foram utilizados cortes com retirada de fragmentos das escamas ventrais (gastrotegos). Como a maior parte das espécies possui bem mais de 100 placas ventrais, esse sistema permite identificar plantéis de animais razoavelmente grandes, embora com muita mão-de-obra, tanto para a marcação quanto para a leitura. Também foram descritas técnicas utilizando pequenos 'brincos' plásticos coloridos através das escamas (Pough, 1970) ou, ainda, praticando queimaduras com gelo seco nas laterais do corpo (Lewke & Stroud, 1974).

Recentemente, uma Instrução Normativa do Ibama (02/2001) estabeleceu a obrigatoriedade de se identificar os animais em criadouros por sistema eletrônico, consistente na utilização de microchips (*transponders*). Estes são implantados subcutaneamente, um pouco à frente da fenda anal, em posição dorso lateral esquerda. Um leitor especial permite identificar, a cerca de 30 cm, o código do *transponder*, que, aplicado corretamente, é bem tolerado e não produz inflamação nem sofre migrações dentro do corpo do animal. Tal sistema é muito prático e aparentemente infalível. Internacionalmente provado, talvez tenha um único inconveniente: o custo elevado.

A Rotina no Serpentário

Obtenção dos animais – captura, desastres naturais, obras de impacto (hidrelétricas, desmatamentos, assentamentos), aquisição ou intercâmbio com outros criadouros.

Recepção e triagem – as serpentes de nosso serpentário são obtidas de duas formas principais:

- animais provenientes da natureza: atualmente representam em torno de 60% do plantel. São sobretudo doadas por particulares, corporações militares ou empresas, ou capturadas por nossos técnicos em domicílios urbanos;
- animais nascidos em cativeiro: representam os 40% restantes do plantel. Nesse contingente, temos empenhado grande esforço, já que se trata de animais com maior potencialidade adaptativa e melhor saúde, além do que representam provavelmente o caminho futuro, embora ainda não tenhamos conclusões definitivas sobre a equivalência imunológica e bioquímica do seu veneno com referência ao dos exemplares oriundos da natureza.

Os animais que ingressam em nosso plantel recebem um número de cadastro, que os identificará a partir desse momento, e em cuja ficha serão anotados o nome da espécie, o sexo, a procedência, a data da captura e o coletor. Eventualmente, são anotados tamanho e peso, além de detalhes característicos do animal.

Acondicionamento e quarentena – o animal já identificado e registrado recebe um tratamento profilático com vermífugo e eventualmente (caso haja ferimentos) os cuidados complementares necessários (curativos, hidratação, antibioticoterapia etc.). Passa então por um período de quarentena, sendo observado do ponto de vista sanitário e de sua adaptação ao cativeiro. Durante a quarentena é oferecida a primeira alimentação, pois a aceitação da mesma representa um bom sinal para a integração ao plantel. Geralmente, a não aceitação do alimento deve-se ao estresse, mas também pode ser por ferimentos internos ou qualquer patologia, nem sempre detectável. Serão necessários ainda muitos estudos até que tenhamos uma idéia mais aprimorada do diagnóstico e clínica desses animais. Entretanto, colocamos, a seguir, uma síntese dos principais problemas de saúde que temos encontrado no serpentário do IVB.

Além das lesões traumáticas, às vezes de bastante gravidade, produzidas freqüentemente no ato da captura, as serpentes apresentam grande variedade de doenças, sendo comum as infecciosas e as parasitárias, agravadas pelo estresse e pelos longos períodos de permanência em condições artificiais e submetidos a manipulação para extrações de veneno.

Em geral, quando se percebe qualquer transtorno no comportamento da serpente, a moléstia já se encontra estabelecida. Portanto, é imprescindível, na rotina de trabalho, prestar atenção até mesmo a pequenas alterações dos hábitos dos animais. Dessa forma, será possível agir prontamente, evitando-se a morte do animal ou a propagação de uma epidemia de conseqüências imprevisíveis no serpentário.

Dependendo dos cuidados no manuseio e das condições de assepsia durante a manipulação dos animais, além da estrutura e higiene dos viveiros de manutenção, poderão ocorrer lesões. É razoavelmente freqüente a ocorrência de ferimentos no focinho ou na mucosa bucal, já que, mesmo condicionadas ao cativeiro, as serpentes tentam a fuga com bastante assiduidade ou dão botes contra as paredes dos viveiros. Essas lesões iniciais podem facilmente virar abscessos. Às vezes, as serpentes são feridas pelos animais oferecidos como alimento no momento da captura.

No inverno o problema das doenças infecciosas torna-se mais crítico, o que induz um aumento na mortalidade. No nosso serpentário, nessa época, costuma ocorrer casos de pneumonia, em particular nas cascavéis, mas também em jararacas.

Dentre os endoparasitas, foram mais freqüentemente observados protozoários flagelados no intestino, mais raramente platelmintos (Trematódeos e Cestódeos). Nos exames coproparasitários aparecem ovos de Nematódeos (*Rhabdias* e *Kallicephalus*).

Achamos interessante relatar nossa experiência com Linguatulídeos (ou Pentastomídeos) da espécie *Porocephalus stilesi* em *Lachesis muta* (Aguiar et al., 1999). A infestação por *Porocephalus stilesi* de *Lachesis muta rhombeata* procedentes da natureza foi de 50% dos exemplares. A infestação é possivelmente produzida, algum tempo depois do nascimento, pela ingestão do hospedeiro intermediário, dado o fato de que serpentes neonatas oriundas da natureza estavam isentas desse parasitismo. O fato de todas as *Lachesis* nascidas em cativeiro não terem sido infestadas ressalta a importância de se implementar um programa de reprodução e criação em laboratório, propiciando um plantel saudável de serpentes para obtenção de veneno para pesquisa e produção de antiveneno.

Um dos problemas mais freqüentes no serpentário é a infestação por ectoparasitos, dentre os quais se destacam os ácaros e os carrapatos. Em 1985, tivemos no serpentário uma infestação gravíssima por ácaros, que só nos meses de janeiro-fevereiro matou cerca de 200 jararacas (80% do plantel de serpentes, na época). Os mesmos foram identificados como *Ophionyssus natricis*. Esse episódio atingiu essa gravidade porque, naquele tempo, o manejo no serpentário era feito em pátios comunitários de 20 m^2, que podiam conter até mais de 100 serpentes cada.

Os carrapatos (*Amblyoma* sp) são freqüentemente observados em serpentes provenientes da natureza. Dessa forma, recomenda-se tomar os devidos cuidados terapêuticos e profiláticos (vermifugação e controle de ectoparasitos) durante o período de quarentena dos animais recém-chegados.

O acondicionamento dos animais é feito nas caixas individuais, como visto oportunamente.

Manutenção – Passado o período de quarentena, o animal é encaminhado a uma sala de manutenção, onde entrará, conforme a espécie, idade etc., num esquema de rotina que envolve, principalmente, as alimentações, cuidados com a higiene e extrações de veneno.

Com referência à periodicidade dos eventos, existe uma rotina semanal para limpeza e troca de caixas, substituição de substrato, troca da água e eventual anotação de fatos relevantes, como mudas de pele, fezes, observação de parasitos, ou comportamento anormal que justifique uma observação mais atenta, feita por clínico veterinário, para avaliar a necessidade de um tratamento especializado.

Medidas profiláticas nas salas, como limpeza e desinfecção de pisos, paredes e prateleiras, também são realizados semanalmente.

Alimentação – a freqüência da alimentação varia com a idade dos animais: para a maior parte das espécies, é semanal nos neonatos até 1 ou 1 ano e meio de vida, quinzenal em animais jovens, entre 1 ano

e meio e 3 anos de idade, e mensal nos animais adultos. A alimentação consiste habitualmente de camundongos albinos, cujo tamanho, peso e quantidade são determinados conforme as necessidades de cada serpente. No caso dos adultos do plantel de produção de veneno, a alimentação é oferecida uma semana após a extração, tempo suficiente para as serpentes se recuperarem do estresse e terem produzido um mínimo de veneno, necessário para a captura e correta digestão do alimento.

Quando uma serpente não aceita alimento de forma espontânea, e uma observação clínica não detecta qualquer patologia, procede-se à alimentação forçada, sobretudo em exemplares que por sua importância justifiquem essa atenção especial. Nas regiões tropicais e em serpentários climatizados, geralmente a freqüência alimentar se mantém durante todo o ano, mas eventualmente ocorre rejeição, regurgitações e aumento de mortalidade durante o inverno. Fêmeas prenhes podem ter sua freqüência alimentar alterada, muitas vezes recusando qualquer alimento durante alguns meses.

Legislação sobre proteção dos animais (no Brasil, Decreto nº 24.645, de 10 de julho de 1934, Art. 3) impede muitas vezes a alimentação de animais com outros animais vivos. Isso, no caso das serpentes, cria um impasse, uma vez que o movimento e o calor corporal costumam ser fatores essenciais para a detecção do alimento. Alguns criadores, no exterior, utilizam com sucesso um artifício que consiste em congelar os camundongos e armazená-los no *freezer* até o momento da alimentação das serpentes, sendo ofertados às mesmas depois de aquecidos em forno de microondas. Essa técnica apresenta algumas vantagens adicionais ao fato humanitário de evitar a dor do envenenamento aos camundongos, tais como a economia de espaço nos biotérios de criação desses mamíferos, possibilitando, por um lado, grandes estoques de alimento em momentos de abundância para serem consumidos oportunamente e, por outro, a eliminação, pelo congelamento, de alguns germes e outros organismos patogênicos, diminuindo assim a possibilidade de contaminação das serpentes.

Outra possibilidade é a utilização de rações pastosas aplicadas diretamente no estômago das serpentes por meio de uma sonda. Vantagens dessa técnica estariam representadas pelo menor gasto de veneno da serpente para se alimentar (pois não há necessidade de injetá-lo na presa), e por evitar o risco de eventuais ataques dos roedores que às vezes ferem gravemente as serpentes, além do que esses alimentos são estéreis, totalmente livres de patógenos e balanceados nutricionalmente.

As desvantagens decorrem da falta, no mercado, de rações e sondas apropriadas para essa finalidade, obrigando os interessados a improvisos. É importante lembrar que o esôfago dessas serpentes é bastante delicado e pode ser ferido e até perfurado pela sonda se a operação não é feita com suficiente cuidado. Outras desvantagens são o aumento significativo do trabalho em grandes plantéis ou, ainda, a exposição dos tratadores a acidentes.

REPRODUÇÃO – o sucesso reprodutivo no nosso serpentário é muito maior entre as espécies vivíparas, ou seja, todas as viperídeas com exceção de *Lachesis muta*. Nossa prática nos mostra que essas espécies apresentam poucos problemas durante a gestação. Entretanto, cabe ressaltar que em várias espécies de nossa fauna temos observado fêmeas prenhes tomando banhos de sol na natureza, o que pode ser muito importante para otimizar o metabolismo da mãe e dos embriões durante a gestação. Essa prática, contudo, muito dificilmente pode ser facilitada no cativeiro, embora possa ser fornecida iluminação artificial mais específica. Nas nossas condições ambientais, a gestação dura em torno de 5 a 7 meses. Temos registros de partos de 3 a 35 filhotes, em *B. jararaca*; de 25 a 59 filhotes, em *B. jararacussu*; e de 6 a 22 filhotes em *Crotalus durissus*. Os partos ocorrem, em sua maioria, entre fevereiro e março em *Bothrops*, e entre dezembro e fevereiro em *Crotalus*.

A incubação dos ovos no laboratório envolve condições higiênicas rigorosas, além de temperatura e umidade controladas e constantes. É dificultada pela contaminação principalmente por fungos, os quais acabam matando os embriões. Essa contaminação se deve, especialmente, à permanência dos ovos na caixa onde se encontra a mãe, que, dependendo das circunstâncias, pode ser de algumas horas até dias.

Nesse período, os ovos desidratam e se contaminam até mesmo com as fezes eventualmente eliminadas pela serpente adulta logo após a postura. Os ovos devem, então, ser limpos com escova ou pincel suave e água destilada, e colocados em caixas contendo um substrato apropriado. No caso, utilizamos vermiculita autoclavada e umedecida com água destilada, numa mistura de pesos iguais de cada elemento. É importante, além dessas condições referidas, que a temperatura permaneça estável durante o período de incubação, já que a submissão a variações aumenta a mortalidade e, em certos casos, causa malformações.

Uma perspectiva interessante para a reprodução em cativeiro está representada pelo desenvolvimento de técnicas de inseminação artificial. Diversos trabalhos relacionados à inseminação em *Crotalus* foram elaborados desde a década de 70 por Langlada e colaboradores (Langlada, 1972, 1975; Langlada & Belluomini, 1972; Langlada, Gonçalves & Rodrigues, 1973; Langlada, Ferreira, & Santos, 1991; Langlada, Santos & Ferreira, 1994).

Um Serpentário Experimental para *Lachesis Muta* no IVB

O sucesso na manutenção da 'surucucu' (*Lachesis muta*) é dificultado por diversas causas, como ferimentos e estresse do animal durante a captura e transporte, e falta de condições apropriadas no cativeiro. A maior das Viperídeas, chegando a 3,5 m de comprimento, é uma raridade nos serpentários, e existe grande dificuldade de captura na natureza. Tentando aprimorar as técnicas de manejo em cativeiro, desenvolvemos um projeto visando ao trabalho de campo e de laboratório, o que forneceu o embasamento necessário para a concepção de uma sala climatizada para estudo e criação da surucucu.

O desafio principal radicou no desconhecimento quase total dos hábitos dessas serpentes e também pelo fato de habitarem matas primárias, onde a umidade é sempre muito alta (acima de 70%) e a temperatura ambiente pouco variável, mantendo-se geralmente entre 24 ºC e 28 ºC, condições muito difíceis de serem reproduzidas no serpentário, onde as temperaturas oscilam bastante diária e sazonalmente.

Em nosso serpentário, durante o verão, a temperatura chega a picos superiores aos 35 ºC, e pode atingir, ocasionalmente, menos de 14 ºC durante o inverno. Assim, foi instalado um sistema de climatização central, que permite manter os dois fatores ambientais mencionados dentro dos parâmetros adequados.

O sistema monitora a temperatura e a umidade relativa do ar em três pontos diferentes da sala por meio de sensores remotos e permite seu ajuste por termostato e umidostato independentes. No recinto principal, de aproximadamente 15 m^2, delimitado por tela adequada para evitar a fuga das serpentes e possibilitar a livre circulação do ar, reproduziram-se as principais condições paisagísticas de uma floresta tropical habitada por *Lachesis muta*. Construiu-se um sistema de circulação de água que forma uma cachoeira entre pedras, comum nos ambientes de mata de encosta onde habitam essas serpentes.

Existem diversas opções de substratos (serapilheira, terra, troncos e pedras de diversos tamanhos), bem como um sistema de escoamento da água no chão, com desnível direcionado para um dreno lateral, o qual permite simulações de chuvas sem causar o alagamento do recinto. A ambientação foi completada com a contribuição de um paisagista experiente, especializado em espécies vegetais nativas. Ele selecionou mais de 30 variedades de diversas famílias, desde arbóreas a epífitas, criando uma comunidade vegetal harmoniosa e representativa da biodiversidade botânica nessas florestas.

As alternativas oferecidas objetivam estabelecer as preferências das serpentes, nas diferentes idades, sazonalmente ou nas diversas fases de vários ciclos vitais, como reprodutivo e alimentar. Esse recinto representa, assim, um instrumento fundamental para nossas pesquisas biológicas em relação a essa serpente, bem como para otimizar a obtenção de veneno, o que garantirá a produção do soro específico, antilaquético. Além disso, os experimentos e resultados até agora alcançados também colocam nosso serpentário num patamar de desenvolvimento só encontrado nos Zoos de San Diego e Dallas, nos Estados Unidos – instituições pioneiras na reprodução e criação de serpentes do gênero *Lachesis*.

Referências Bibliográficas

Aguiar, A. S. et al. Parasitismo por *Porocephalus stilesi* (Sambon, 1910) (Pentastomida) em *Lachesis muta rhombeata* WIED, 1824 (Serpentes: Viperidae). In: V Congreso Latinoamericano de Herpetologia, 1999, Montevideo. *Resumo*.

Amaral, A. Contribuição à biologia dos ophidios brasileiros (habitat, habitos e alimentação). 1ª nota prévia. *Collectânea dos Trabalhos do Instituto Butantan*, 2:175-181, 1927.

Ashley, B. D. & Burchfield, P. M. Maintenance of a snake colony for the purpose of venom extraction. *Toxicon*, 5:267-275, 1968.

Belluomini, H. E. Produção de veneno de serpentes em cativeiro. Comparação de resultados entre serpentário exposto e biotério aquecido. *Arquivos do Instituto Biológico,* 31(4):149-154, 1964.

Belluomini, H. E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 12(45):82-96, 1984.

Belluomini, H. E. & Kemenes, A. Biotério experimental de serpentes peçonhentas. *Ciência e Cultura*, 19:348-349, 1967.

Brazil, V. *Contribution à l'Etude de l'Intoxication d'origine Ophidienne*. Paris: A. Maloine ed., 1905.

Brazil, V. *La Défense Contre L'ophidisme*. São Paulo: Pocai-Weiss & C., 1914.

Campell, J. A. & Lamar, W. W. *The Venomous Reptiles of Latin America*. Ithaca: Cornell University Press, 1989.

Da Silva Jr., N. J. *Micrurus*. In: Nicolella, A. et al. (Eds.) *Acidentes com Animais Peçonhentos: consulta rápida*. Porto Alegre, 1997.

Getreyer, W. K. The handing of venomous snakes. *Literatura serpentarium*, 5:234-244, 1985.

Glenn, J. L. & Straight, R. Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* venom: variation in toxicity with geographical origin. *Toxicon*, 16(1):81-84, 1978.

Gutiérrez, J. M. et al. Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica. *Toxicon,* 28:419-426, 1990.

Hoge, A. R. & Romano, S. A. R. W. L. Neotropical pit vipers, sea snake, and coral snakes. In: Bucherl, W. & Buckley, E. (Eds.) *Venomous Animals and their Venoms*. New York: Academic Press, 1971. v.2.

Hoge, A. R. & Romano-Hoge, S. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Memórias do Instituto Butantan*, 42/43:373-496, 1981.

Kardong, K. V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids & elapids. *Memórias do Instituto Butantan,* 46(1982):105-118, 1983.

Langlada, F. G. Ciclo sexual bienal de serpentes *Crotalus* do Brasil – comprovação. *Memórias do Instituto Butantan*, 36:67-72, 1972.

Langlada, F. G. Combat-dance between males of brazilian *Crotalus durissus*. *Journal of Herpetology*, 9:349-351, 1975.

Langlada, F. G. & Belluomini, H. E. Contribuição à técnica operatória de serpentes. I. Hemipenicectomia bilateral em serpentes. *Memórias do Instituto Butantan*, 36:73-78, 1972.

Langlada, F. G.; Gonçalves, M. F. & Rodrigues, E. T. Determinação da época de fecundidade em fêmeas do gênero *Crotalus*. *Memórias do Instituto Butantan*, 37:253-260, 1973.

LANGLADA, F. G.; FERREIRA, I. & SANTOS, S. Atividade espermática de *Crotalus durissus* e a capacidade de fecundação. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 63(4):427, 1991.

LANGLADA, F. G., SANTOS, S. & FERREIRA, I. Techniques of artificial insemination in Crotalus durissus terrificus (Viperidae-Crotalinae). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 31(2):141-144, 1994.

LELOUP, P. Essais de rationalisation dans le maintien dún serpentarium à but industriel. *Acta Tropica*, 30:281-311, 1973.

LELOUP, P. Observation sur la reproduction de *Bothrops moojeni* en captivité. *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia*, 62:173-201, 1975.

LELOUP, P. Various aspects of venomous snake breeding on a large scale. *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia*, 78:177-198, 1984.

LEWKE, R. E. & STROUD, R. K. Freeze-branding as a method of marking snakes. *Copeia*, 4:997-1000, 1974.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). Producción y pruebas de control en la producción de antisueros diftérico, tetánico, botulínico, antivenenos y de la gangrena gaseosa. *Manual de procedimientos*. Washington, D.C.: OPS, 1977.

POUGH, F. H. A quick method for permanently marking snakes and turtles. *Herpetologica*, 26(4):428-430, 1970.

ROZE, J. *Coral Snakes of the Americas. Biology, identification, and venoms*. Malabar/Florida: Krieger Publishing Company, 1996.

SAZIMA, I. Um estudo de biologia comportamental da jararaca, Bothrops jararaca, com uso de marcas naturais. *Memórias do Instituto Butantan*, 50(3):83-99, 1988.

WILLEMSE, G. T. Individual variation in snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology (B),* 61(4): 553-557, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Progress in the characterization of venoms and standarization of antivenoms*. Geneva: WHO, 1981.

24

Principais Zoonoses

Leda Maria Silva Kimura

Introdução

Zoonoses são enfermidades transmitidas naturalmente dos animais ao homem. Apesar dos avanços verificados no seu controle, a incidência de zoonoses permanece alta em todos os países em desenvolvimento. Zoonoses emergentes aparecem constantemente como resultado de troca de comportamento de algumas doenças e podem se transformar em ameaças, como a hantavirose.

Mais de 200 zoonoses são conhecidas, sendo causa de consideráveis morbidade e mortalidade em grupos demográficos vulneráveis, especialmente crianças, idosos e trabalhadores ligados às áreas da saúde pública e veterinária.

A saúde humana e a animal estão indissoluvelmente ligadas. Os seres humanos dependem dos animais para sua nutrição, companhia, desenvolvimento tecnológico, socioeconômico e científico.

Sendo os animais de laboratório essenciais para o desenvolvimento e testes de vacinas, controle da qualidade de inúmeros medicamentos, ensino e pesquisas de diferentes enfermidades, serão abordadas a seguir algumas zoonoses que podem representar perigo aos profissionais que lidam nessa área.

Coriomeningite Linfocitária

Etiologia: vírus ARN, gênero *Arenavirus*; família Arenaviridae.

Transmissão: o reservatório principal, e provavelmente o único, é o camundongo, fonte de infecção para as demais espécies animais, incluindo o homem. Nesses animais, a infecção é persistente, ao passo que para o homem e outros animais apresenta duração limitada. Os camundongos eliminam o vírus por secreções nasais, urina, sêmen, leite e fezes. A infecção congênita e neonatal é muito importante para essa espécie. O vírus se transmite tanto vertical como horizontalmente. A infecção pode ser adquirida pelo homem através de aerossóis, por via conjuntival, pela pele, ou simplesmente ao se visitar uma colônia.

Sintomas nos animais: os camundongos infectados naturalmente raramente apresentam sintomas clínicos. A doença apresenta baixa mortalidade, porém os animais jovens que se recuperam sofrem atrasos no desenvolvimento. Durante a enfermidade, o animal apresenta um ataque convulsivo característico e quase sempre fatal. A doença pode evoluir para a morte ou apresenta completa recuperação com resposta imune normal e eliminação do vírus. Os animais que se contaminam por via uterina mantêm o vírus durante toda a vida.

Sintomas no homem: a infecção tem um curso variável, desde clinicamente inaparente a mortal, em alguns casos raros. Em geral, é uma enfermidade benigna, apresentando sintomatologia similar à da influenza. O período de incubação dura de 1 a 2 semanas. A forma clínica similar à influenza pode ser resolvida em poucos dias ou o paciente pode sofrer uma recaída com sintomas meníngeos. A meningite também pode se apresentar desde o início sem estar antecedida por outros sintomas, porém, nesse caso, a incubação é mais longa, de 2 a 3 semanas. Os sintomas consistem em rigidez da nuca, febre, dores musculares. Em raras ocasiões pode haver meningoencefalite, com alteração dos reflexos profundos, paralisia, anestesia cutânea e sonolência, podendo levar à morte. A infecção pode interferir na gestação causando danos ao feto (encefalites, hidrocefalia, coriorretinites).

Diagnóstico:
provas sorológicas:
- fixação de complemento;
- soroneutralização;
- imunofluorescência indireta.

isolamento do vírus:
- inoculação de camundongos por via intracerebral (sangue e líquido cefalorraquidiano dos pacientes suspeitos).

Controle:
- quarentena dos animais recém-adquiridos;
- em colônias de camundongos, deve-se efetuar vigilância periódica mediante provas sorológicas;
- impedir a presença de roedores silvestres nos biotérios;
- evitar a presença de mulheres gestantes em biotérios sem a proteção adequada;
- utilização, por parte dos funcionários, de proteção adequada (gorros, máscaras, luvas, macacões, botas etc.).

Tratamento: sintomatológico.

Animais para experimentação afetados: *hamsters*, ratos, camundongos.

Hantavirose

Etiologia: vírus RNA; família Bunyaviridae.

Transmissão: os ratos silvestres são os hospedeiros naturais do *Hantavírus*. O homem é infectado ao inalar a poeira formada a partir do ressecamento da urina e das fezes dos roedores.

Sintomas nos animais: os ratos silvestres são portadores assintomáticos, podendo apresentar perigo emergente caso haja contaminação principalmente em colônias de ratos e camundongos.

Sintomas no homem: os primeiros sintomas da infecção por *Hantavírus* se assemelham aos da influenza: febre, dores musculares, cefaléia, náuseas, vômitos, calafrios e tonturas. Nos casos mais graves, o doente sofre hemorragia e insuficiência renal ou pulmonar. Em cerca de 5 dias, mais de 50% das vítimas morrem.

Diagnóstico: isolamento do vírus.

Controle:
- impedir a presença de roedores silvestres nos biotérios;
- utilização, por parte dos funcionários, de proteção adequada (gorros, máscaras, luvas, macacões, botas etc.).

Herpesvirus Simiae

Etiologia: *Herpesvirus simiae* (herpesvirus B); vírus DNA; família Herpesviridae; subfamília Alphaherpesvirinae.

Transmissão: o principal reservatório natural é o macaco rhesus (*Macaca mulatta*.) Outros primatas não-humanos podem ser fontes de infecção para o homem. A infecção é transmitida dentro de uma colônia de primatas por contato direto, contaminação de alimentos e água com saliva, mordeduras, arranhões e aerossóis. O homem contrai a infecção por mordeduras ou lesões da pele contaminadas com saliva de primatas e também por aerossóis através da conjuntiva, nariz e faringe. Há descrito caso de infecção acidental em laboratório por ruptura de frasco com cultivo de rim de macaco.

Sintomas nos animais: nos primatas, as infecções são subclínicas e resultam em infecções latentes que persistem por toda a vida do animal. Ocasionalmente, os animais são observados com ulcerações labiais ou linguais (semelhante às lesões de *Herpesvirus simplex* no homem). Essas lesões orais são fonte de grande quantidade de vírus e representam perigo para as pessoas que trabalham com primatas, uma vez que o vírus B causa encefalomielite fatal no homem.

Sintomas no homem: o homem é um hospedeiro acidental. *Herpesvirus simiae* não se transmite de homem para homem. A infecção humana depende sempre da fonte animal. O período de incubação é estimado entre 1 a 5 semanas a partir da exposição. Se a infecção é produzida por mordedura ou arranhão, pode haver formação de vesícula no ponto da ferida, seguida de linfangites e linfadenites. A enfermidade generalizada se manifesta por febre, cefaléia, náuseas, dor abdominal e diarréia, podendo apresentar faringite vesicular, retenção urinária e pneumonia. Os sintomas neurológicos apresentam, inicialmente, dores musculares, vertigens, espasmos diafragmáticos, dificuldade de deglutição e dores abdominais. Depois, há paralisia flácida das extremidades inferiores que se estende às extremidades superiores e ao tórax até terminar com colapso respiratório. As manifestações de encefalite ou encefalomielite podem durar de 3 a 21 dias.

Diagnóstico: em humanos com sinais de encefalite e histórico de contato com primatas, deve-se considerar a possibilidade de infecção por *Herpesvirus simiae*. A maior parte dos casos humanos se confirmou *post mortem*, por isolamento do vírus do cérebro ou da medula. Quando a duração da enfermidade permite a aparição de anticorpos, pode-se efetuar o diagnóstico mediante a prova de soroneutralização, assim como nos primatas não-humanos.

Controle:

- quarentena de 6 a 8 semanas para animais introduzidos na colônia;
- sacrifício de animais com lesões orais sugestivas de vírus B ou sorologia positiva;
- utilização, por parte dos funcionários, de proteção adequada (gorros, máscaras, luvas, macacões, botas etc.).

Animais para experimentação afetados: primatas não-humanos.

Raiva

Etiologia: vírus RNA; gênero *Lyssavirus;* família Rhabdiviridae.

Transmissão: os hospedeiros que mantêm o vírus rábico na natureza são os carnívoros e os quirópteros. A transmissão se dá através de soluções de continuidade.

Sintomas nos animais: nos cães, distinguem-se duas formas, a raiva furiosa e a paralítica ou muda; segue a sintomatologia nervosa predominante: o período de incubação varia de 10 dias a 2 meses ou mais. Na fase prodrômica, os cães manifestam mudança de conduta, escondem-se em lugares escuros ou demonstram grande agitação. A excitabilidade reflexa é exaltada e o animal se sobressalta ao menor estímulo. Apresenta anorexia, irritação na região da mordedura, estimulação das vias geniturinária e um ligeiro aumento da temperatura corporal. Depois de 1 a 3 dias, acentuam-se, de forma notória os sintomas de excitação e agitação. O cão se torna perigosamente agressivo, com tendência a morder objetos, animais e o homem, inclusive seu próprio dono; muitas vezes morde a si mesmo, infligindo-se graves feridas. A salivação é abundante, uma vez que o animal não deglute a saliva em conseqüência da paralisia dos músculos da deglutição. Há alterações no latido por causa da paralisia parcial das cordas vocais. Na fase terminal da enfermidade, pode-se observar convulsões generalizadas, incoordenação muscular e paralisia dos músculos do tronco e das extremidades.
A forma muda caracteriza-se pelo predomínio de sintomas paralíticos, de maneira que a fase de excitação é muito curta ou não está presente. A paralisia começa pelos músculos da cabeça e do pescoço, o animal tem dificuldade na deglutição e geralmente há suspeitas de que o cão esteja engasgado com osso. O tratador, ao socorrê-lo, expõe-se à infecção. Logo, sobrevém paralisia das extremidades, paralisia geral e morte. O curso da enfermidade dura de 1 a 11 dias.

Sintomas no homem: a enfermidade começa com uma sensação de angústia, cefaléia, elevação da temperatura corporal, mal-estar, anorexia, náuseas, irritabilidade, alterações sensoriais imprecisas, e o paciente se queixa de hiperestesia e parestesia no local da inoculação. Na fase seguinte da excitação, há hiperestesia e uma extrema sensibilidade à luz, ao som e ao vento, além de midríase e aumento da salivação. Com a evolução da doença, há espasmos nos músculos da deglutição e os líquidos são vigorosamente recusados, embora os pacientes sintam sede e até manifestem o desejo de beber. Essa disfunção da deglutição é comum na maioria dos enfermos. Muitos deles experimentam contrações espasmódicas laringofaríngeas à simples visão de um líquido (hidrofobia) e se recusam a engolir a sua própria saliva. Pode-se também observar espasmos dos músculos respiratórios, ansiedade, delírio e convulsões generalizadas. Os sintomas de hiperatividade podem ser predominantes até a morte ou substituídos por uma fase de paralisia generalizada. Em alguns casos, a hiperatividade é muito curta e em quase todo o decorrer da doença predomina a sintomatologia paralítica. A enfermidade dura de 2 a 6 dias ou mais e, de modo invariável, termina com a morte.

Diagnóstico: coleta de cérebro de animais suspeitos

- imunofluorescência direta;
- prova biológica (inoculação em camundongos);
- exame histopatológico.

Controle:

- vacinação dos animais;
- vacinação preventiva dos funcionários envolvidos em experimentos que utilizem animais susceptíveis;
- utilização, por parte dos funcionários, de proteção adequada (gorros, máscaras, luvas, macacões, botas etc.).

Tratamento: não há.

Animais para experimentação afetados: cães e primatas não-humanos.

Febre por Mordedura de Rato

· etiologia: *Streptobacillus moniliformis* e *Spirillum minus*.

Infecção por *Streptobacillus moniliformis*

Transmissão: os reservatórios da infecção são os ratos que albergam o agente etiológico na nasofaringe e são transmitidos, por mordedura, ao homem. A infecção dos camundongos de laboratório pode ser produzida por via aerógena quando são alojados no mesmo ambiente com ratos.

Sintomas nos animais: os ratos são portadores sadios. Às vezes, são observadas lesões purulentas nesses animais. *S. moneliformes* é patogênico para camundongos e em algumas epizootias se registrou alta morbidade e mortalidade com sintomas como poliartrite, gangrena e amputação espontânea dos membros. Em cobaias, pode produzir uma linfadenite cervical com grandes abscessos nos gânglios linfáticos regionais.

Sintomas no homem: o período de incubação dura de 2 a 14 dias. A enfermidade se inicia com uma sintomatologia similar à da influenza. A ferida da mordedura é curada de modo espontâneo e sem complicações. É comum o exantema, a linfadenopatia regional, as artralgias migratórias e as mialgias. Em alguns casos mais severos, observa-se poliartrite e endocardite. Nos casos não tratados a mortalidade chega a 10%.

Diagnóstico: isolamento de *S. moniliformes* (em meios enriquecidos com soro e sangue) de material proveniente das lesões articulares ou de amostras de sangue.

Controle: os camundongos, ratos e cobaias de laboratório devem se alojar em diferentes ambientes, e os funcionários do biotério devem ser instruídos sobre o manejo apropriado.

Tratamento: penicilina e estreptomicina de 7 a 10 dias.

Animais para experimentação afetados: ratos, camundongos.

Infecção por *Spirillum minus*

Transmissão: o reservatório são os ratos e outros roedores. A saliva é fonte de infecção para o homem e a transmissão é por mordedura.

Sintomas nos animais: a infecção nos ratos é inaparente.

Sintomas no homem: o período de incubação é de 1 semana a 2 meses. A febre começa bruscamente e tarda a desaparecer, porém recorre em várias ocasiões durante 1 a 3 meses. Observa-se uma erupção exantemática generalizada que pode aparecer em cada ataque febril. A ferida apresenta infiltração edematosa e ulceração, e gânglios linfáticos hipertrofiados.

Diagnóstico: a bactéria não se desenvolve em meios de cultivo de laboratório. O diagnóstico se realiza à base de exame microscópio em campo escuro do infiltrado da ferida.

Controle: igual infecção por *S. moniliformes*.

Animais para experimentação afetados: ratos, camundongos.

Leptospirose

Etiologia: *Leptospira interrogans.*

Quadro 1 – Principais sorogrupos de *L. interrogans* de interesse veterinário

SOROGRUPO	SOROTIPO	ESPÉCIE
Ballum	*Ballum*	roedores
Icterohaemorrhagiae	*icterohaemorrhagiae*	cães
Canicola	*Canicola*	cães

Transmissão: o animal reservatório (roedores, especialmente ratos) excreta leptospiras na urina. Nas colônias de animais de laboratório, onde a infecção penetra, podem ser afetados 80% de ratos e camundongos. A infecção do homem e de outros animais se produz por via direta ou indireta através da pele e das mucosas nasal, bucal e conjuntival. A via mais comum é a indireta, através de águas, solo e alimentos contaminados por urina de animais infectados. Grande variedade de sorotipos foi isolada de camundongos de todo o mundo, predominando, entretanto, *L. ballum* em colônias de albinos suíços. Os camundongos infectados podem superar a infecção aguda e se tornarem disseminadores crônicos. Concentrações de leptospira podem ser demonstradas agrupadas nos túbulos renais de camundongos assintomáticos, tornando-os reservatórios permanentes. Alguns cães excretam sorotipos na urina continuamente por meses e até anos após a infecção.

Sintomas nos animais: em roedores, a doença dificilmente apresenta sintomas. Em cães, a infecção pode variar de forma assintomática a quadros clínicos graves. A forma mais grave é a hemorrágica, que se instala repentinamente com febre por 3 a 4 dias, seguida por rigidez e mialgias nos membros posteriores, hemorragias na cavidade bucal com tendência a necrose e faringite. Em uma etapa posterior, pode haver gastroenterite hemorrágica e nefrite aguda. Tanto na infecção por *canicola* quanto por *icterohaemorragiae* pode haver icterícia e principalmente na infecção por este último sorovar.

Sintomas no homem: o período de incubação da enfermidade dura de 1 a 2 semanas. A sintomatologia humana é muito variável, desde casos leves, praticamente assintomáticos, até outros com cefaléia, febre, vômitos, mal-estar geral, petéquias cutâneas, conjuntivite, às vezes icterícia, meningite, encefalite e, em casos raros, até a morte se a doença progredir sem diagnóstico.

Diagnóstico:

- imunofluorescência;
- *Enzyme-Linked Immune Serum Asssay* (Elisa).

Controle:

- quarentena dos animais recém-adquiridos;
- impedir o acesso de roedores silvestres aos biotérios e estoques de ração;
- utilização, por parte dos funcionários, de proteção adequada (gorros, máscaras, luvas, macacões, botas etc.);
- em cães a imunização tem sido eficaz na redução da incidência e severidade da leptospirose canina, mas não previne o estado de portador, podendo levar a infecção ao homem.

Animais para experimentação afetados: ratos, camundongos, cobaias, gambás, cães, primatas não-humanos.

Listeriose

Etiologia: *Listeria monocytogenes.*

Transmissão: a bactéria pode ser eliminada pelas fezes e se encontra presente nos fetos abortados e na placenta; a infecção se dá por contato. A doença pode ser observada sobretudo em coelhos, cobaias, caninos e no homem.

Sintomas nos animais: a enfermidade afeta as fêmeas gestantes. Os machos e as fêmeas não-prenhes oferecem grande resistência. É produzida septicemia com lesões no útero que conduzem ao aborto. Pode ser observado meningoencefalite em láparos. Nos casos septicêmicos, são encontrados focos de necrose no fígado e no baço, infiltrados por células mononucleares. Em cães, a enfermidade pode se confundida com a raiva por causa dos sintomas de encefalite. Há casos de surtos em coelhos e cobaias.

Sintomas no homem: o aborto por listéria, na mulher, é produzido na segunda metade da gestação. Os sintomas que precedem alguns dias ou semanas do aborto consistem em calafrios, febre, cefaléia e tonteira. Eles podem se repetir ou não antes do aborto ou do feto a termo enfermo. Depois do parto, a mãe não apresenta sintomas da enfermidade, porém a bactéria pode ser isolada da vagina, do colo uterino e da urina por períodos de alguns dias até várias semanas. Se a criança nasce viva, morre pouco tempo depois de septicemia por essa bactéria. Algumas crianças nascem aparentemente sãs e apresentam meningite aproximadamente 3 semanas após o parto. A hidrocefalia é uma seqüela comum da meningite neonatal. Há descrições de veterinários com erupção cutânea após manejo de fetos infectados.

Diagnóstico: o diagnóstico pode efetuar-se por isolamento do agente. Em casos de septicemia, deve-se coletar sangue. Nas fêmeas, deve-se cultivar secreções vaginais e fezes. Nos fetos septicêmicos, a listéria pode ser isolada de qualquer órgão, e nos casos de meningoencefalite ou meningite, do líquido encéfalo-raquidiano.

Controle:

- quarentena dos animais recém-adquiridos;
- incineração das placentas e fetos abortados;
- em coelhos: sacrifício dos animais infectados;
- mulheres grávidas que trabalham em biotérios: exames periódicos principalmente após sintomatologia semelhante à da influenza;
- utilização, por parte dos funcionários, de proteção adequada (gorros, máscaras, luvas, macacões, botas etc.).

Animais para experimentação afetados: cobaias, coelhos, cães.

Salmonelose

Etiologia: *Salmonella enterica.*

Transmissão: os camundongos de laboratório podem eliminar várias espécies de *Salmonella* simultaneamente, sem mostrar nenhum sinal clínico da enfermidade. As formas de transmissão geralmente são pela ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes de animais infectados ou portadores. O cão pode contrair a infecção por coprofagia de outros cães e de outros animais. Podem se infectar também por alimentos contaminados.

Sintomas nos animais: apesar de os camundongos serem portadores assintomáticos, podem apresentar sintomatologia quando submetidos a estresse. Apresentam, então, postura encurvada com distensão abdominal, lerdeza, pelagem áspera, perda de peso, fezes brancas ou de coloração clara e diarréia. Podem apresentar conjuntivite e respiração acelerada. A morte pode sobrevir em 1 semana. Em cães, podemos observar gastroenterite. Em serpentes, faz parte da flora intestinal, podendo apresentar patogenicidade para o homem.

Sintomas no homem: todas as infecções por *Salmonella*, excluindo *S. tiphi* (específica do homem), podem ser consideradas zoonoses. A Salmonelose talvez seja a zoonose mais difundida no mundo. Causa no homem uma infecção intestinal que se caracteriza por um período de incubação de 6 a 72 horas após a contaminação. Caracteriza-se por sintomas de gastroenterite grave: náuseas, vômitos, diarréia, dores abdominais e febre.

Diagnóstico: isolamento do agente etiológico das fezes.

Controle:

- quarentena nos animais recém-adquiridos;
- utilização, por parte dos funcionários, de proteção adequada (gorros, máscaras, luvas, macacões, botas etc.);
- sacrifício dos animais portadores.

Animais para experimentação afetados: camundongos, cobaias, ratos, cães, serpentes, gambás, primatas não-humanos.

Dermatomicoses

Etiologia: diversas espécies de *Microsporum* e *Trichophyton*.

Transmissão: os reservatórios naturais dos dermatófitos zoófilos são os animais. A transmissão se faz por contato com o animal infectado (enfermo ou portador) ou por esporos contidos nos pêlos e escamas dérmicas desprendidos do animal. Os dermatófitos permanecem viáveis no epitélio descamado por muitos meses. A transmissão de animal a animal se produz pelas mesmas vias.

Sintomas nos animais: nos camundongos e cobaias de laboratório, a doença se manifesta geralmente sem lesões aparentes; sua presença se detecta muitas vezes pelo contágio humano. Nos cães, as lesões são freqüentes e aparentes e podem se apresentar em qualquer parte do corpo em forma de tinha arredondada.

Sintomas no homem: a dermatofitose é uma infecção superficial da camada córnea da pele ou dos pêlos e unhas. As espécies de *Microsporum* causam grande parte das dermatofitoses da cabeça e do corpo, porém, raramente são responsáveis pelas infecções das unhas. As espécies de *Trichophyton* podem invadir a pele de qualquer parte do corpo.

Diagnóstico: isolamento do agente em meios de cultivo.

Controle:

- quarentena nos animais recém-adquiridos;
- utilização, por parte dos funcionários, de proteção adequada (gorros, máscaras, luvas, macacões, botas etc.).

Tratamento: antimicóticos de aplicação local e/ou griseofulvina por via oral.

Animais para experimentação afetados: camundongos, ratos, cobaias, cães.

Bibliografia

Acha, P. M. & Szyfres, B. *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales*. 2.ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 1986.

Caparó, A. C. *Manual de Patologia de Animales de Laboratorio*. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 1982.

Corrêa, W. M. & Corrêa, N. M. *Doenças Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. São Paulo: Médica e Científica Ltda., 1992.

25

Delma Pegolo Alves
Luiz Augusto Corrêa Passos
Ana Maria Aparecida Guaraldo
Marcos Zanfolin

Introdução

A evolução do conhecimento na área biomédica exigiu que os ensaios passassem a ser realizados de forma totalmente controlada. Para tanto, foi necessário o aprofundamento das atividades de várias áreas como aquelas relacionadas às drogas, reagentes e equipamentos, entre outros. Entre essas áreas, destaca-se a ciência em animais de laboratório, que passa a apresentar dois objetivos principais: a produção de animais já estabelecidos para a pesquisa biomédica e o desenvolvimento de novos modelos. Esses novos modelos seriam utilizados para responder a perguntas específicas, e por esta razão a sua constituição genética, o seu *status* sanitário e o ambiente no qual são produzidos passam a ser determinantes.

Nesse contexto, surgem os animais gnotobióticos. Palavra de origem grega, *gnotos* significa "bem conhecida" e *biota* "forma de vida associada". Assim, o modelo gnotobiótico é constituído de um animal criado em ambiente controlado e portador de uma flora associada totalmente conhecida.

Os primeiros estudos na área da gnotobiologia foram iniciados com Luis Pasteur, que investigou a sobrevivência de organismos superiores na ausência de bactérias. Entretanto, obstáculos como a manutenção dos animais em um ambiente isento de germes dificultavam a realização desses testes. A solução surgiu com o desenvolvimento de equipamentos capazes de criar um ambiente que, embora artificial, permitisse o alojamento dos animais e o estudo das relações entre eles e a microbiota.

As diversas aplicações científicas desses animais serão discutidas no decorrer deste capítulo. Antes, porém, apresentamos, a seguir, uma pequena revisão histórica dos pontos de maior relevância dessa nova ciência.

1895 – Nuttall & Thierfelder conservam a vida de uma cobaia por 15 dias, na ausência de bactérias, porém sem crescimento.
1914 – Kuster mantém uma cabra por 1 mês com crescimento normal e sem contaminação bacteriana.
1930 – Reyners relata seus esforços para obter a primeira cobaia *germfree* em ambiente estéril.
1930-1933 – Reyners desenvolve projeto para o estudo da variação bacteriana em organismos superiores.
1934 – Reyners & Trexler introduzem a tecnologia para a manutenção de animais axênicos e para a construção de um novo modelo de isolador.
1936 – Uso de isoladores na histerectomia de macacos e cobaias e desenvolvimento de isoladores para galinhas.
1939 – Simpósio na Universidade de Notre Dame: Micrurgical and *Germfree* Methods.
1943 – First Symposium on Gnotobiotic Technology e desmame do primeiro rato axênico.
1948 – Gustafsson: desenvolve isolador rígido em aço inox.
1951-1956 – Reyners mantém em uso, por cinco anos, um isolador em aço inox. Assim, foram produzidos 286 ratos e registradas 10 contaminações.

1956 – National Meeting of the Animal Care Panel. Reyners propõe o uso de colônias de animais Specific Pathogen Free (SPF) como modelo para pesquisa biomédica, em decorrência da qualidade do animal derivado das colônias de unidades isoladoras.
1957 – Trexler & Reynolds: desenvolvem o primeiro isolador flexível com baixo custo.
1959 – Second Symposium on Gnotobiotic Technology, abordando a importância dos animais SPF e da Flora Definida no desenvolvimento da ciência.
1960 – Utilização de animais *germfree* na rederivação de estoques de animais de empresas privadas e comercialização dos primeiros animais *germfree* para pesquisa.
1962 – Third Symposium on Gnotobiotic Technology. Do evento participaram 110 pesquisadores em apresentação de trabalhos, mesa-redonda e discussão sobre animais gnotobióticos. Nessa década, mais de 40 laboratórios já estavam utilizando isoladores flexíveis e 4 empresas privadas comercializavam roedores gnotobióticos.
1962 – Trexler: deixa o Albert Einstein College of Medicine para desenvolver isoladores hospitalares.
1966 – Trexler e o Staff da Royal Veterinary College desenvolvem isoladores para animais de grande porte.

A Gnotobiologia no Brasil

No Brasil, em 1961, as pesquisas em gnotobiologia foram iniciadas pelo professor Dr. Enio Cardillo Vieira, na Universidade Federal de Minas Gerais, com projeto sobre crescimento e reprodução de caramujo *Biomphalaria glabrata* em condições axênicas, criados em tubos de ensaio. Posteriormente, os caramujos axênicos foram cultivados em isoladores de plástico flexível. Em 1979, o pesquisador importou uma colônia de camundongos axênicos da Universidade de Notre Dame (EUA) e, desde então, diversos trabalhos têm sido realizados utilizando esses animais.

Classificação Sanitária dos Animais

A classificação dos animais de laboratório está relacionada ao tipo de biotério: aberto (animais sanitariamente não definidos) ou fechado (com uma complexidade variável do sistema de barreiras, capaz de manter colônias sanitariamente definidas).

AXÊNICO (*GERMFREE*): totalmente livres de flora microbiana associada, mantidos em unidade isoladora.

GNOTOBIÓTICO: com flora microbiana associada definida.

SPF: livres de patógenos específicos.

COBS: Cesarian Obtained Barrier System. São animais derivados de cesariana e mantidos sob sistema de barreiras.

VAF: Virus Antibody Free. São animais que não possuem anticorpos virais sorologicamente demonstráveis.

Objetivos da Gnotobiologia

A gnotobiologia apresenta uma vasta aplicação, possibilitando a elaboração de ensaios experimentais multidisciplinares. Entretanto, alguns dos objetivos podem ser claramente evidenciados. Dentre eles destacamos:

- obtenção de matrizes livres de patógenos na derivação de novas colônias de animais em biotério para pesquisa biológica;

- elucidação das inter-relações entre o hospedeiro e sua flora microbiana associada;
- eliminação da interferência dessa flora no estudo de fenômenos biológicos.

Comparação entre Animais Convencionais e *Germfree*

A utilização e a comparação entre animais convencionais e *germfree* mostram a influência e o papel da flora quanto às modificações qualitativas do conteúdo gástrico, à anatomia do tubo digestivo, à fisiologia digestiva e geral, à modificação do sistema imunitário do tubo digestivo, além do efeito barreira. Essas modificações envolvem o tubo digestivo e o trato intestinal, exposto à ação da microflora.

A seguir, destacaremos os efeitos importantes em nível de fisiologia geral e o efeito barreira.

Fisiologia Geral

Os animais *germfree* apresentam crescimento, peso e temperatura corporal iguais aos animais convencionais. No animal *germfree*, o coração é menor, e como conseqüência também o são o funcionamento cardíaco, o fluxo de sangue para a pele, fígado e intestino e o consumo de oxigênio.

Conforme descrito por Gordon (1965), os animais *germfree* apresentam paredes capilares e alveolares no pulmão menos espessas. A maturação sexual no *germfree* é mais lenta.

Alterações do Tubo Digestivo

Nos animais axênicos, o conteúdo cecal tem um pH maior, em virtude da ausência dos ácidos graxos voláteis produzidos pelo metabolismo fermentativo da microflora intestinal.

Não há diferença histológica estomacal entre o *germfree* e o convencional. A ausência de microflora não causa modificações de peso e da estrutura histológica do pâncreas. A morfologia do intestino delgado no rato e na cobaia axênicos difere pelo peso menor, mucosa mais lisa e uma população menor de células reticuloendoteliais; a superfície da mucosa intestinal, no rato axênico, é 30% menor, sendo maior nas partes média e inferior do intestino delgado. As vilosidades são maiores na parte proximal e menores na parte distal do intestino delgado.

Estudos de micrografia eletrônica mostraram que as microvilosidades apresentam comprimento menor na presença da microflora. O decréscimo em relação ao axênico é de 5% no duodeno, 9% no jejuno e 18% no íleo.

No animal axênico, o trânsito intestinal é lento. Os animais axênicos ainda apresentam números reduzidos de placas de Peyer e de plasmócitos.

Efeito Barreira

A flora bacteriana intestinal normal protege o hospedeiro contra a instalação de agentes patogênicos. Esse fenômeno de rejeição dos microorganismos exógenos é denominado efeito de eliminação ou de barreira.

Descrição do Isolador Equipamento

Apresentação dos Componentes Básicos do Isolador

Para que haja eficiência no isolamento do animal durante o ensaio experimental, o equipamento deve apresentar as seguintes estruturas fundamentais.

Estrutura principal, corpo ou envelope – deve ser, do ponto de vista óptico, transparente para melhor visualização dos animais no interior do equipamento. Nos equipamentos flexíveis, utiliza-se uma grande variedade de material plástico como polietileno, polipropileno, poliuretano; no entanto, o *polyvinycloride* (PVC) é o material mais comum para a confecção do equipamento. Os isoladores precisam ter PVC de espessura fina, resistência à ruptura e caráter atóxico. Devem também apresentar a vantagem de ajustar-se facilmente à pressão durante o manejo.
Os isoladores rígidos são confeccionados em aço inox, PVC rígido, fibra de vidro, sendo assim fortes e resistentes. Apresentam inconveniente em relação à restrição aos movimentos do operador. Para determinadas espécies de animais (por exemplo, as aves), adota-se isoladores rígidos ou semi-rígidos.

Porto de passagem – é o local através do qual os materiais são introduzidos e retirados do isolador. O porto deve possuir diâmetro e localização, de acordo com as necessidades do ensaio experimental. As extremidades externa e interna do porto de passagem são revestidas por membranas plásticas denominadas capas, sendo removidas para a introdução ou retirada dos materiais. Esse tipo de porto de passagem é denominado de convencional.

Luvas de manuseio – as luvas podem ser de cano curto ou longo. O tipo de luva a ser adotado dependerá das atividades que serão desenvolvidas. Nos trabalhos que envolvem agentes químicos, as luvas devem ser avaliadas freqüentemente.
Com o decorrer do tempo, as luvas de borracha podem apresentar microfissuras que, apesar de imperceptíveis, oferecem risco potencial de contaminação. Nesse contexto, a adoção de luvas de cano curto se torna mais adequada por assegurar a sua reposição mesmo com o equipamento em uso.

Filtros de ar – a estrutura do filtro é cilíndrica, de forma a possibilitar maior superfície de contato com o ar e permitir a deposição do material filtrado. O elemento filtrante deve ser preferencialmente hidrófobo e apresentar atividade *high efficiency in pore activity* (Hepa), retendo assim 99,99% de partículas com o diâmetro superior a 0,3 m. O conjunto deve ser esterilizado no forno Pasteur a uma temperatura de 180 °C durante 120 minutos, ou autoclavados a 121 °C por 30 minutos.

Motor de insuflação – o ar é insuflado no equipamento por meio de um motor, permitindo um volume médio de 16 a 18 trocas de ar por hora. Alguns equipamentos podem oferecer motores para exaustão. São os isoladores de pressão negativa.

Figura 1 – Unidades isoladoras flexíveis

Fonte: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (Cemib/Unicamp).

Nos protocolos experimentais, onde há risco de contaminação para o pesquisador e para o meio ambiente em virtude da manipulação de agentes zoonóticos, adota-se isoladores com 'pressão negativa'. Nesse modelo de equipamento, caso ocorra um acidente, há entrada de ar externo, impedindo o comprometimento do meio ambiente.

Já nos casos nos quais os ensaios experimentais são realizados com animais livres de zoonoses, a escolha deve ser de isoladores com 'pressão positiva' (Fig. 1), pois no caso de um eventual acidente que comprometa o 'corpo principal' do equipamento, o ar sai, salvaguardando a integridade dos animais mantidos em seu interior.

Em ambos os modelos, a pressão final média é de 2 mm a 4 mm de coluna de água abaixo ou acima da pressão atmosférica normal.

Acessórios Básicos

A manutenção da rotina exige a utilização de alguns acessórios essenciais: o cilindro de esterilização e a luva de transferência.

Cilindro de esterilização – acessório confeccionado em aço inoxidável com perfurações na porção mediana que serão cobertas por três camadas de elemento filtrante com atividade Hepa. Uma de suas extremidades é aberta, possibilitando o alojamento dos insumos básicos (ração, maravalha etc.). Após a colocação desses materiais, a extremidade é selada com uma membrana termorresistente e fixada com fita resistente a altas temperaturas. O cilindro é então introduzido na autoclave para ser esterilizado.

Luva de transferência – permite a conexão entre o cilindro e o porto de passagem. A luva apresenta dois orifícios, nos quais são pulverizadas/vaporizadas as soluções germicidas utilizadas na esterilização.

Acessórios Especiais

Tanto a manutenção de colônias de animais em centros de bioterismo como o desenvolvimento de alguns protocolos experimentais, algumas vezes, exigem acessórios especiais. Dentre esses, destacamos:

Manômetro diferencial – fornece indicações da pressão no interior do isolador quando em uso, indicando também o momento de troca dos filtros.

Sistema *no break* – é acionado quando ocorre interrupção de energia elétrica, mantendo o isolador inflado. É particularmente importante nas instituições que não têm sistema central de segurança (grupo gerador).

Válvula na saída de ar – permite rápida compensação das oscilações na pressão oriundas do manuseio. É, portanto, um acessório que possibilita um controle rápido da pressão no interior do equipamento.

Controlador de temperatura e umidade – torna possível o registro das temperaturas mínimas e máximas no período. Quando a temperatura ultrapassa a faixa do bem-estar animal, o organismo sofre alterações, principalmente aumentando a freqüência respiratória, cardíaca e elevando a temperatura.

Preparo de Unidades Isoladoras

A montagem dos isoladores, com seus respectivos acessórios, necessita de cuidados que possam assegurar a integridade do equipamento e a manutenção do *status* microbiológico das colônias.

Antes de efetuar a lavagem, desinfecção e esterilização, o isolador deve ser montado, inflado e avaliado quanto a sua integridade; para essa avaliação, pode ser usado o gás Freon 12.

Antes da ocupação do equipamento, recomenda-se a adoção dos seguintes procedimentos:

- Lavar todos os componentes do equipamento separadamente (corpo plástico ou envelope, luvas e punhos, chapéus interno e externo, tapetes, suportes e capas dos filtros, rolhas de borracha) com detergente para retirada de sujeira e gordura.
- Montar o equipamento e proceder a lavagem e desinfecção interna do corpo com detergente comum ou, preferencialmente, com solução detergente de amônia quaternária 0,5%.
- Enxaguar com água destilada/filtrada e enxugar. Aplicar álcool 70% com pulverizador.
- Introduzir os materiais que podem ser expostos a soluções químicas (tapete, gaiolas, pinças, rolhas de borracha, chapéu interno) e pulverizar toda a superfície interna e materiais com um poderoso germicida como o ácido peracético diluído 1:2.
- Deixar todos esses materiais expostos durante um período de 48 horas. Em seguida, romper o lacre dos filtros e proceder a ventilação até a completa retirada de resíduos do produto químico utilizado (por exemplo, o ácido peracético).
- Os filtros de ar montados com manta de lã de vidro em estruturas metálicas de aço inoxidável devem ser previamente esterilizados pelo calor seco a 180 °C durante 120 minutos. A autoclavagem a 121 °C por 30 minutos pode ser utilizada, porém, os filtros devem ser colocados em estufa para secagem após o processo. OBS.: em isoladores utilizados para manutenção de colônias axênicas e gnotobióticas, alguns procedimentos adicionais são indispensáveis. Indicamos, a seguir, alguns desses procedimentos.

1º – Durante a montagem do equipamento, deve-se assegurar que as superfícies de contato nas diferentes junções entre as partes estejam embebidas com a solução esterilizante. Os principais locais são:

- corpo principal e porto;
- corpo principal e chapéu externo;
- anéis e luva;
- anéis e punho;
- corpo principal e filtros de ar.

2º – Recomenda-se uma segunda esterilização após 48 horas de ventilação da primeira.

3º – Em conseqüência do desgaste natural dos componentes plásticos do equipamento, com surgimento de microfissuras e também a possibilidade de acidentes não percebidos, recomenda-se que a cada 3 a 6 meses novas colônias sejam formadas em outros equipamentos. Tal procedimento permite que as unidades em uso possam ser novamente avaliadas quanto a sua integridade estrutural.

Após a limpeza e desinfecção do equipamento, deve-se iniciar o preparo dos materiais que serão introduzidos no isolador e que servirão tanto na manutenção dos animais quanto para a avaliação sanitária do ambiente de seu interior. Para tanto, o cilindro de esterilização deverá ser montado com os seguintes itens:

- ração e maravalha: ambos colocados em sacos de algodão, de fácil manipulação e permeáveis ao vapor;
- toalhas para manter a limpeza da parede interna, possibilitando uma boa visão;
- frascos/tubos de ensaio para coleta de material para testes de esterilidade;
- *swabs*, meios de cultura para a realização dos testes;
- indicadores biológicos: tiras impregnadas com 10^6 esporos de *Bacillus stearothermophylus* (microorganismo resistente a altas temperaturas);
- indicadores físico-químicos: fita com indicador de autoclave 3M e anidrido succínio em pó, que apresenta um ponto de fusão cuja temperatura é conhecida;
- gaiolas e tampas, frascos de bebedouros. Com exceção dos bebedouros, os outros materiais podem também ser introduzidos após desinfecção química no porto de passagem.

Após o preparo, o cilindro deve ser autoclavado a uma temperatura de 125 ºC por um período de 30 minutos.

Validação do Equipamento e Materiais

A ocupação do isolador somente poderá ser feita após a certificação de que o equipamento está pronto, tanto do ponto de vista físico (integridade quanto a rupturas no corpo principal e vazamentos provenientes de falhas na montagem, entre outros) quanto do ponto de vista sanitário. Tais cuidados são mais necessários quando o objetivo é a manutenção de animais *germfree* e gnotobióticos.

Por essa razão, recomenda-se a coleta de amostras de *swabs* embebidos em meio de cultura de enriquecimento (BHI/TPB). A porção do equipamento a ser investigada é a superfície interna. Após o teste, o *swab* deverá ser semeado em caldo BHI, Tioglicolato e Sabouraud.

Paralelamente, deverão ser retiradas amostras da ração e maravalha que serão igualmente semeadas nos mesmos meios de cultivo (caldo BHI, Tioglicolato e Sabouraud).

As tiras contendo *Bacillus stearothermophylus*, introduzidas no preparo de materiais, também deverão ser retiradas e cultivadas a fim de se avaliar a eficiência do processo de esterilização.

Todas as amostras deverão ser incubadas à temperatura ambiente (25 ºC), 37 ºC e a 55 ºC, de 5 a 7 dias.

A Utilização de Técnicas Gnotobióticas na Ciência de Animais de Experimentação, na Pesquisa e na Indústria

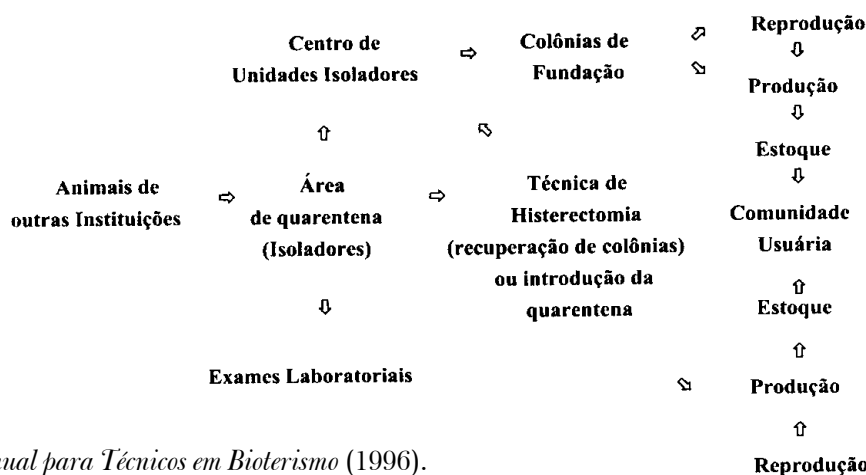
Centros de Bioterismo (Animais de Laboratório)

Conforme será observado em outros pontos, várias são as tecnologias originadas com o bioterismo e que são essenciais em centros dessa área.

Em centros de bioterismo, os isoladores são utilizados para realizar a preservação, manutenção de colônias de fundação de linhagens SPF, axênicas, gnotobióticas ou *germfree*, assegurando o padrão sanitário das colônias.

É indicado para a manutenção de animais provenientes de outras instituições em unidades isoladoras, visando ao estabelecimento de quarentena, até a certificação do padrão sanitário dos animais (Fig. 2).

Auxílio na técnica de derivação cesariana para obtenção de animais livres de contaminações (Sebesteny & Lee, 1973). A histerectomia é adotada como técnica simples para eliminar a maioria dos patógenos de animais que apresentam transmissão horizontal, sendo realizada, em condições totalmente assépticas, em unidades isoladoras construídas especialmente para essa finalidade.

Figura 2 – Apresentação esquemática do uso de unidades isoladoras em biotérios

Fonte: *Manual para Técnicos em Bioterismo* (1996).

Uso de Técnicas Gnotobióticas na Derivação Cesariana como Ferramenta para a Descontaminação de Colônias

Em virtude da sua simplicidade, a derivação cesariana já há muito tempo é utilizada em centros de bioterismo dos países do primeiro mundo, bem como rotineiramente nas empresas produtoras de animais, como a Iffa Credo, Charles Rivers, Taconic, Olac, entre outras. Com essa técnica, é possível a eliminação da maioria dos patógenos de animais que apresentam transmissão horizontal, sendo, portanto, útil para obtenção de colônias SPF livres de vírus, bactérias e parasitas.

A técnica deve ser realizada em condições assépticas dentro de unidades isoladoras especialmente construídas para essa finalidade.

Uma maior eficiência é observada desde que a sua realização aconteça dentro das condições abaixo indicadas:

- acasalamento programado das fêmeas receptoras SPF e doadoras convencionais, mediante sincronismo do ciclo estral;
- preparo do isolador de histerectomia especialmente construído para essa finalidade;
- conexão entre o isolador de histerectomia e isolador com fêmea receptora;
- sacrifício da fêmea doadora por deslocamento cervical;
- preparo do abdômen para retirada do útero;
- isolamento do cérvix e dos cornos uterinos por amarração e retirada asséptica do útero (nos casos em que a técnica esteja sendo realizada em equipamento apropriado, essa retirada deve ser feita no primeiro compartimento do isolador de histerectomia);
- passagem do útero para o segundo compartimento do isolador de histerectomia através de um tanque de imersão com solução anti-séptica (amônia quaternária a 0,5% °C a 37 °C);
- retirada e reanimação dos neonatos;
- transferência dos neonatos reanimados para o isolador com a fêmea receptora.

OBS.: a derivação cesariana deve ter início 12 horas antes do parto normal.

Por Que Utilizamos a Derivação Cesariana?

Infelizmente, o caráter epidemiológico em colônias fechadas (*closed colony*) é extremamente elevado. Por essa razão, a introdução de animais contaminados nas colônias desencadeará uma rápida disseminação e em pouco tempo acabarão por comprometê-las de diferentes maneiras.

Além dos prejuízos que serão impostos à comunidade usuária, os patógenos comprometerão também as colônias instaladas no próprio biotério.

Dentre os prejuízos que serão observados com os agentes mais comumente encontrados destacamos:

- Interferência na reprodução diminuindo a fertilidade e causando a morte de animais:
  - ✓ Vírus de hepatite do camundongo (MHV)
  - ✓ Vírus Sendai
  - ✓ Vírus Sialodacrioadenite (SDAV) do rato
- Alta mortalidade de neonatos, anormalidades nos hormônios sexuais, alterações patológicas no trato reprodutivo, infecção em embriões causando alta taxa de aborto:
  - ✓ *Cryptosporidium* sp
  - ✓ Rotavírus

- Alteração de vários parâmetros reprodutivos: motilidade dos espermatozóides, implantação de embrião, ossificação do esqueleto do feto, alteração da citologia vaginal, prejuízos nos testes de fertilização *in vitro*, redução da fertilidade em até 50% e distúrbio na transferência de embriões, além de teratologia.
  - ✓ *Mycoplasma pulmonis*

Embora a placenta e o sistema imunológico da mãe constituam uma importante 'barreira', existem patógenos capazes de contaminar os animais ainda durante a gestação, quer por rompimento da barreira placentária, quer por serem residentes da cavidade uterina.

Dentre eles, destacamos:

- Agentes que atravessam a barreira placentária:
  - ✓ Retrovírus murino (leucemia, tumor mamário)
  - ✓ Vírus da coriomeningite linfocitária (LCM)
  - ✓ Vírus da ectromélia (poxvírus)
  - ✓ Parvovírus (Kilhan rat- KRV, toolan-H1, MVM)
  - ✓ *Clostridium piliforme*
- Infecção uterina (provavelmente sem passar a barreira placentária):
  - ✓ *Pasteurella pneumotrópica*
  - ✓ *Salmonella* sp
  - ✓ *Mycoplasma pulmonis*
  - ✓ *Escherichia coli* (fase progestacional)

A técnica de derivação cesariana realizada sistematicamente (e em alguns casos mais de uma vez em gerações sucessivas), mostra-se bastante eficiente na erradicação desses patógenos.

A Utilização de Unidades Isoladoras em Ensaios Experimentais

Atualmente, diversos modelos de isoladores são confeccionados e utilizados para fins de experimentação.

Nos países do primeiro mundo, a aplicação dessa tecnologia é bastante comum. Em alguns países em desenvolvimento, como o Brasil, a utilização desse equipamento na pesquisa tem se acentuado de maneira significativa. A principal razão para essa mudança é a segurança que o equipamento oferece.

Dentre as inúmeras aplicações que justificam sua utilização, podemos citar:

- Os isoladores possibilitam a realização de experimentos com animais imunodeficientes como Scid, XID, NOD, Nude e outros, obtidos por meio de manipulação genética como o *knockout*, assegurando qualidade e reprodutibilidade aos resultados.
- Essa tecnologia oferece segurança ao estudo com agentes zoonóticos.
- A produção de anticorpos em camundongos ou ratos tendo em vista a realização de *Map Test* (*Mouse Antibody Production Test*) ou *Rat Test* (*Rat Antibody Production Test*). Esses testes consistem na inoculação de animais SPF, VAF (*Virus Antibody Free*) imunocompetentes, com amostras de material biológico específico. Após quatro semanas, avalia-se a produção de anticorpos contra agentes infecciosos que pudessem estar presentes nas amostras. A técnica somente pode ser realizada em isoladores onde as condições são controladas, impedindo a ocorrência de interferências na produção dessas moléculas.

A Aplicação de Unidades Isoladoras na Indústria

Com o advento dos isoladores, não apenas os laboratórios de pesquisa ou os centros de bioterismo se beneficiaram. Na indústria farmacêutica, por exemplo, os isoladores são utilizados em diversas etapas, estendendo-se desde a pesquisa de um novo fármaco até o seu envase. Além disso, o preparo de soluções, os testes de esterilidade e a manipulação de drogas tóxicas, entre outras rotinas, são realizados com o auxílio dessa tecnologia.

Nos países desenvolvidos, as indústrias farmacêuticas investem milhões de dólares em isoladores, uma vez que é imprescindível a qualidade dos processos na aprovação de novos princípios ativos. Atualmente, o nível de exigência dos processos instalados nessas indústrias estimulou o surgimento de empresas cuja atividade principal é desenvolver novos modelos de isoladores.

Entretanto, não é apenas na produção de fármacos que essa tecnologia se faz presente. A indústria eletrônica, por exemplo, também se beneficia da segurança oriunda das unidades isoladoras. Para elas, a produção e o armazenamento de componentes microeletrônicos, de forma que os mesmos fiquem protegidos da interferência de poeiras tóxicas, é um importante fator de qualidade no processo de fabricação.

Tillett (1999) descreveu o uso dos isoladores na indústria como uma alternativa para manter a sala limpa, pois é possível o preparo de produtos com níveis de riscos 2 e 3. O equipamento utilizado em produtos com nível de risco 2 apresentava paredes rígidas em acrílico e policarbonato. O equipamento para manipulação de produtos com nível de risco 3, por envolver a manipulação de patógenos perigosos e agentes citotóxicos, possuía um desenho capaz de prevenir a contaminação cruzada entre o operador e os produtos, bem como entre estes e o meio ambiente externo.

Aplicação das Técnicas Gnotobióticas e dos Isoladores em Humanos: imunodeficiência e cirurgias

O comprometimento imunológico descrito como 'deficiência imune severa combinada' ou Scid (*Severe Combined Imune Deficiency*) é uma síndrome rara, congênita, que resulta na ausência da imunidade por células B e T. A doença foi identificada pela primeira vez em crianças, por volta de 1950 (Glanzmann & Riniker, 1950; Hitzig et al., 1958). Os portadores dessa síndrome morriam antes de completarem um ano de idade.

Embora alguns pacientes Scid possam ser tratados através de transplante de medula óssea, quase sempre os doentes são notavelmente susceptíveis a infecções por uma série de agentes, e a maioria só sobrevive quando completamente isolados do ambiente exterior. Essa condição ímpar somente pode ser oferecida com unidades isoladoras, tais como a descrita por Travnicek et al. (1977). O equipamento idealizado por esse autor possibilitou a manutenção de um bebê em condições estéreis e controladas após a realização da cesariana.

Travnicek & Mandel (1987) relataram um caso com pressuposição de imunodeficiência anterior ao nascimento. A partir dessas considerações, foi possível realizar a cesariana em isolador com condições totalmente assépticas. Durante um mês, o bebê foi mantido no equipamento e nesse período foi possível investigar sua condição imunológica e realizar a colonização com bactérias de linhagens selecionadas, preparando-o para a repopulação da microbiota.

Tanto as experiências quanto as tecnologias realizadas em gnotobiologia têm beneficiado o homem de diferentes maneiras. Um exemplo é a influência nos cuidados com nascimentos prematuros e com neonatos de alto risco, observado na pediatria contemporânea.

Pacientes são mantidos em unidades isoladoras para prevenção de infecções pós-operatórias, tratamento de queimaduras e de sistema imunológico imunossuprimido (Cohn Jr. & Heneghan, 1991), além de tratamento de pacientes com leucemia aguda (Trexler, Spears & Gaya, 1975).

Em cirurgias ortopédicas, o isolador desempenha um importante papel na prevenção de infecções pós-operatórias (Zucman & Benichou, 1978).

Hirsch, Renier & Pierre-Kahn (1978) mostraram a eficiência do isolador em cirurgias e a redução das infecções em pacientes que estavam em tratamento de hidrocefalia. Essa eficiência foi atribuída à eliminação de agentes contaminantes provenientes do ar (*airborn*) e à manipulação asséptica.

Trexler, Emond & Evans (1977) descreveram o uso de isoladores de plástico com pressão negativa para a manutenção de pacientes com suspeitas de infecções de risco como lassa, marburg e vírus ebola. Com esse equipamento, pacientes foram mantidos por 32 dias, assegurando a integridade do ambiente hospitalar e eliminando os riscos para a equipe médica.

Doença como a leucemia é freqüentemente acompanhada pela imunodeficiência clínica, após o transplante de medula óssea. Pacientes mantidos em isoladores e sob sistema de barreiras apresentam menor incidência de doença GVHD (enxerto *versus* hospedeiro) após o transplante (Mahmoud et al., 1984).

A Influência da Gnotobiologia na Infra-Estrutura em Pesquisa para o Desenvolvimento de Novos Modelos

De certa forma, os isoladores permitem a manipulação do sistema imunológico, uma vez que, experimentalmente, camundongos imunodeficientes SCID/SCID (homozigotos) são utilizados como receptores de células derivadas do sistema imunológico do homem. Esses camundongos não possuem linfócitos T e B, embora tenham células hematopoéticas normais. Quando os camundongos CB17 SCID/SCID são inoculados com linfócitos humanos, os linfócitos sobrevivem e funcionam durante vários meses no animal, produzindo anticorpos e células T imunes. Esse sistema imunológico humano pode ser testado quanto a sua capacidade de compor resposta a uma vacina em experimentação, por exemplo, contra o HIV.

Entretanto, os camundongos SCID somente podem ser criados no interior de unidades isoladoras. É uma condição estrita, pois em ambiente aberto, mesmo que sanitariamente controlado, esses modelos podem reverter para a forma *Scid leaky*, imunologicamente anormal e descaracterizada por apresentar baixo título de imunoglobulinas. Portanto, os equipamentos asseguram que os animais manipulados possam permitir o estudo de doenças como a AIDS sob condições definidas e adequadas, bem como endossam qualificação de protocolos terapêuticos em condições apropriadas e isentas de riscos para o homem.

A introdução de genes exógenos em organismos vem sendo progressivamente utilizada em diversas áreas da biologia dos mamíferos. A maior parte desse trabalho tem sido realizada com camundongos, embora os mesmos princípios sejam aplicáveis a outros animais, como porcos, coelhos, ovelhas. Por essa razão, os camundongos transgênicos são animais modificados, possibilitam a expressão de genes *in vivo* e devem ser isolados de outros de forma a se evitar a disseminação genética na natureza oriunda, por exemplo, da fuga do animal manipulado. Outro caso no qual o animal geneticamente modificado é residente obrigatório desses equipamentos é na produção de animais *knockouts*. Estes têm, em sua maioria, comprometimento do sistema imune e, por isso, necessitam de tratamento diferenciado para que seu uso seja viável, quer seja para programas de reprodução, quer seja para a experimentação.

Em países desenvolvidos, é comum a utilização desses equipamentos e de suas tecnologias. Porém, em países da América Latina como o Brasil, a carência de programas que promovam a divulgação de seu uso é notória. Apenas algumas instituições e centros de pesquisa presentes na região Sudeste do País os utilizam e mantêm programas de formação de recursos humanos especializados em sua operação.

Outros Equipamentos Originados a partir dessas Tecnologias

Nos países desenvolvidos, é muito grande a utilização de equipamentos oriundos da otimização das condições de ambiente.

Essas novas tecnologias não apenas reduzem os custos da construção ou da adequação física para biotérios de porte médio, mas principalmente permitem a instalação de biotérios experimentais com excelente nível de segurança e dentro das necessidades de cada espécie animal.

Em países como França, Alemanha, Inglaterra e Estados Unidos é comum considerar esses equipamentos nos projetos de pesquisa ou de adequação física de biotérios de centros de pesquisa ou de produção animal.

Dentre esses equipamentos, destacam-se as estantes ou armários ventilados (Fig. 3).

Figura 3 – Estantes ventiladas para camundongos e ratos. Área instalada no Instituto de Pesquisas Energéticas (Ipen-SP)

Foto: Alesco Indústria e Comércio Ltda.

Estantes ou Armários Ventilados

Atualmente, existem vários tipos de estantes que podem ser adotadas para a manutenção dos animais utilizados em experimentação, como camundongos, ratos, coelhos e outros.

Assim como os isoladores, as estantes ventiladas aumentam a segurança sanitária, reduzindo o risco de infecções que poderiam interferir nas pesquisas. São adequadas para laboratórios em função da otimização do espaço aliada ao manejo simples dos animais. É possível a manutenção de camundongos e ratos na mesma estante, pois o equipamento possui compartimentos independentes.

Normalmente, esse equipamento é confeccionado em material resistente às exigências das rotinas e tem capacidade para alojar uma razoável quantidade de animais. O sistema de 'insuflamento' do equipamento

possibilita o deslocamento de ar nos diversos níveis sobre as gaiolas, portanto a retirada de amônia e CO_2 é contínua. Assim, há eliminação dos odores provenientes das excretas dos animais, bem como dos poluentes por eles gerados.

No Brasil, diversas instituições de pesquisa possuem esses equipamentos, demonstrando que o uso dessa tecnologia tem crescido nos últimos anos, em virtude, sobretudo, da praticidade do equipamento, mas também graças à conscientização, por parte da comunidade, da influência das condições ambientais na obtenção de resultados reprodutíveis e universais.

Microisoladores ou *Top Filters*

Existem divergências para a definição e utilização desses equipamentos. A experiência nos permite inserir a observação de que a manutenção de colônias de camundongos e ratos em isoladores pressupõe uso contínuo e prolongado com total segurança. Nesse contexto, os microisoladores ou *top filters* não oferecem a mesma proteção aos animais. Os microisoladores ou *top filters* são utilizados para a manutenção de ensaios experimentais (sem risco de zoonoses). Procedimentos especiais devem ser adotados, tais como troca de gaiolas em fluxo laminar, entre outros.

Referências Bibliográficas

COHN JR., I. & HENEGHAN, J. B. Germfree animals and technics in surgical research. *American Journal Surgery*, 161(2):279-283, 1991.

GLANZMANN, E. & RINIKER, P. Essentielle lymphocytophthise. Ein neus Krankheitsbild aus der Saulingspathologie. *Annals Paediatrica*, 175:1-32, 1950.

GORDON, H. A. *Germfree* animals in research: an extension of the pure culture concept. *Triangle*, 7(3):108-121, 1965.

HIRSCH, J. F.; RENIER, D. & PIERRE-KAHN, A. Influence of the use of a surgical isolator on the rate of infection in the treatment of hydrocephalus. *Childs Brain*, 4(3):137-150, 1978.

HITZIG, W. H. et al. Agammaglobulinämieand Alymphocytose mit Schwund de lymphatischen Gewebes. *Helv Paediatrica Acta*, (13):551-585, 1958.

MAHMOUD, H. K. et al. Laminar air flow versus barrier nursing in marrow transplant recipients. *Blut*, 49(5):375-381, 1984.

SEBESTENY, A. & LEE, P. Unidirectional air flow surgical isolator for hysterectomy of mice. *Laboratory Animal*, 7(3):271-277, 1973.

TILLET, L. Barrier isolators as an alternative to a cleanroom. *American Journal Health-System Pharmacy*, 15, 56(14):1433-1436, 1999.

TRAVNICEK, J. & MANDEL, L. *Germfree* newborn baby. *Nahrung*, 31(5-6):631-633, 1987.

TRAVNICEK, J. et al. Equipment for *germfree* caesarean section and baby care. *Folia Microbiology* (Praha), 22(6):523-526, 1977.

TREXLER, P. C.; SPEARS, A. S. & GAYA, H. Plastic isolators for treatment of acute leukaemia patients under "*germfree*" conditions. *British Medical Journal,* 6, 4(5996):549-552, 1975.

Trexler, P. C.; Emond, R. T. & Evans, B. Negative-pressure plastic isolator for patients with dangerous infections. *British Medical Journal*, 27(2):559-561, 1977.

Zucman, J. & Benichou, J. Use of an isolator (so called "bubble") in orthopaedic surgery. *Acta Chirurgie Belgium*, 77(1):39-44, 1978.

Bibliografia

Coates, M. E. & Gustafson, B. E. (Eds.). *The* Germfree *Animal in Biomedical Research*. London: London Laboratory Animals Ltda., 1984.

Mrozek, M. et al. Efficiency of air filter sets for the prevention of airborne infections in laboratory animal houses. *Laboratory Animal*, 28(4):347-354, 1994.

Passos, L. A. C. & Alves, D. P. Isoladores. In: De Luca, R. R. et al. (Orgs.) *Manual para Técnicos em Bioterismo.* 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Trexler, P. C. & Reynolds, L. I. Flexible film apparatus for the rearing and use of *germfree* animals. *Applied Microbiology,* 5:406-412, 1957.

Trexler, P. C. *Gnotobiotics.* In: Foster, H. L. & Small, D. J. (Orgs.) *The Mouse in Biomedical Research.* London: Fox Academic Press, 1983. v.III.

Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1986.

26

Criopreservação de Embriões Murinos em Biotérios

Luiz Augusto Corrêa Passos
Ana Maria Aparecida Guaraldo
Delma Pegolo Alves
Luiz Afonso Pires
Thiago Marinho Santana
Thiago Henrique Cimadon Dini

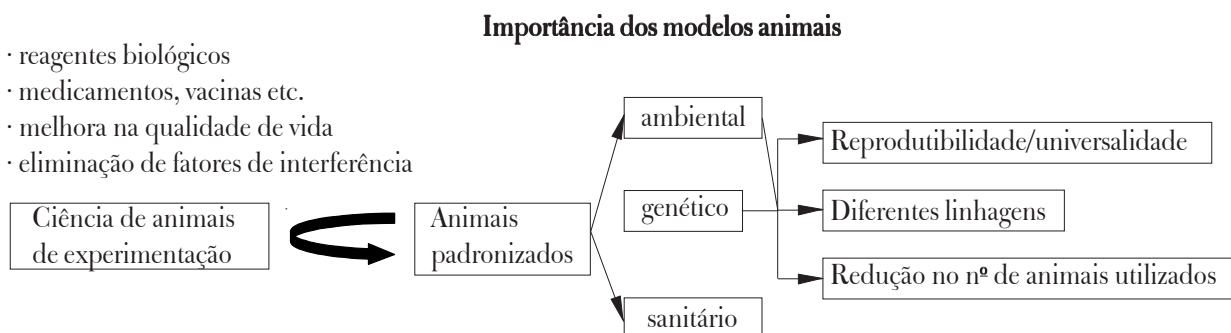
Introdução

O desenvolvimento científico e tecnológico influi diretamente na qualidade de vida da população humana. Novas técnicas, pesquisas e tendências são assimiladas diariamente pela sociedade, tornando-se, rapidamente, eventos corriqueiros. Na verdade, estamos de tal modo acostumados com certos avanços que sequer pensamos no quão difícil era, há alguns anos, executar certas tarefas, curar certos males ou mesmo escrever um texto de fácil entendimento.

Particularmente nas ciências biomédicas, os avanços nos propiciaram um melhor entendimento da natureza da qual fazemos parte. Palavras como DNA, clonagem, ecossistema e genoma já fazem parte do vocabulário de pessoas que não estão envolvidas com a execução direta da ciência, mas que são diretamente influenciadas por ela. O sucesso da pesquisa científica não pode ser negado. O fato de hoje confiarmos nos serviços médicos, abandonando técnicas de curandeirismo, e dispormos de um arsenal cada vez mais completo de vacinas, drogas e técnicas cirúrgicas se deve a esse avanço tecnológico. Entretanto, um resultado científico somente é válido se possuir reprodutibilidade.

Com isso, fez-se necessário o surgimento de um outro ramo da ciência, capaz de fornecer modelos animais adequados às necessidades dos pesquisadores e que, acima de tudo, pudessem garantir tal reprodutibilidade. Além disso, com o surgimento desse novo ramo e de modelos animais, a interferência nos resultados foi sendo sistematicamente reduzida, garantindo um dinamismo cada vez maior à pesquisa científica.

Assim, o estabelecimento da ciência e tecnologia em animais de laboratório possibilitou a padronização dos modelos tanto do ponto de vista de seus aspectos biológicos e de saúde quanto das condições de ambiente, nas quais os mesmos devem ser mantidos. Entre essas novas exigências, destacam-se a adequação do espaço físico, a qualidade do modelo animal e o controle dos materiais em insumos necessários à manutenção das colônias. Como conseqüência dessa padronização sanitária, genética e ambiental, passamos a observar uma redução no número de animais utilizados, assegurando a universalidade e a reprodutibilidade experimentais, bem como o desenvolvimento de novas tecnologias (Fig. 1).

Figura 1 – Algumas das conseqüências da padronização dos modelos animais

Entre as tecnologias desenvolvidas, destaca-se a criopreservação de embriões murinos, assunto que será discutido no decorrer deste capítulo.

Histórico da Manipulação de Embriões

No fim do século XIX, cientistas interessados no estudo de aspectos relacionados à reprodução e ao desenvolvimento de organismos superiores iniciaram os primeiros ensaios com a finalidade de estabelecer metodologias que permitissem a manipulação de embriões. Inicialmente, o coelho foi o modelo experimental adotado, tendo em vista suas características biológicas favoráveis, como o tamanho relativamente grande do ovo (o que facilitava a manipulação) e a ovulação induzida pelo acasalamento, fato de elevada conveniência para a definição precisa da idade dos embriões.

Entretanto, os resultados obtidos não foram totalmente satisfatórios. As dificuldades relativas à compreensão das necessidades nutricionais e as limitações impostas pelas características físico-químicas dos meios de coleta e cultivo até então utilizados consistiam em barreiras técnicas a serem rompidas.

No princípio do século XX, juntamente com o desenvolvimento da química fina responsável pela obtenção de reagentes livres de impurezas, que poderiam ser críticas do ponto de vista toxicológico, a embriologia passou por progressos significativos com profundos reflexos no sucesso de coleta e cultivo de embriões no estágio de pré-implantação.

Assim, apenas na década de 40 do século XX, com Hammond, o cultivo de embriões pôde ser conduzido de maneira sistemática até a fase de 'blastocisto'. Todavia, estágios de desenvolvimento mais precoces ainda careciam de ajustes na formulação dos meios. Conseqüentemente, tornou-se impossível que os embriões se enquadrassem em índices de qualidade, possibilitando maiores avanços, embora certas barreiras técnicas tivessem sido rompidas (vias de acesso para implante, instrumental básico adequado etc.).

Finalmente, em meados da década de 50, Withen propôs uma nova formulação, que passaria a ser utilizada tanto na coleta quanto no cultivo de embriões. Essa nova formulação se mostrou bastante eficiente, ampliando significativamente o número de embriões implantados com sucesso. Posteriormente, outros fatores relacionados à importância das condições de cultivo para o sucesso do implante seriam apontadas por Anne MacLaren.

Com isso, estavam solucionados os aspectos básicos, porém essenciais, das etapas de coleta, congelamento, descongelamento e implante de embriões. A década de 60 foi de grande importância para tal desenvolvimento. Esforços foram realizados de forma a esclarecer tanto as necessidades nutricionais dos embriões quanto os mecanismos envolvidos na cinética da água em células submetidas a temperaturas abaixo de zero, e sua influência na viabilidade dos embriões congelados.

Agora já é possível o estabelecimento de bancos de embriões – local onde podem ser armazenadas grandes quantidades de linhagens (elevado estoque potencial) por um período indeterminado –, nos quais estes podem estar protegidos tanto de contaminações sanitárias quanto de uma deriva genética.

Quadro 1 – Histórico resumido da embriologia experimental

· **Fim do século XIX**: Uso de coelhos para estudos de embriologia (primórdios da embriologia experimental);
· **1875**: Van Beneden – descrição dos estágios de pré-implantação;
· **1890**: Heape – análise e manipulação do oviduto (primeiros esforços visando ao implante);
· **1929**: Lewis & Gregory – estudo de mórulas em cultura;
· **1949**: Hammond – cultivo de embriões de camundongos de 8 células até a fase de blastocisto;
· **1951**: Beathy – implante de embriões de camundongos;

Quadro 1 – Histórico resumido da embriologia experimental (continuação)

· **1956**: Withen – sucesso no cultivo de embriões de camundongos de uma célula até blastocisto;
· **1958**: Anne MacLaren – demonstra que as condições de cultivo interferem no sucesso do implante;
· **1963**: Mazur – diminuição de energia cinética da água em células submetidas a temperaturas abaixo de zero e a probabilidade de congelamento intracelular;
· **1965**: Brinster – nutrição de embriões na fase de pré-implantação e técnica de cultivo em microgota;
· **Década de 70**: Brinster – banco de embriões;
· **1971**: Cultivo sistemático pós-descongelamento de embriões de camundongos (estudos de viabilidade);
· **1974**: Banco de embriões influenciando o futuro desenvolvimento genético;
· **1975**: Sobrevida de embriões de ratos pós-congelamento.

Criopreservação e Tecnologia de Manipulação de Embriões

Importância e Aspectos Básicos

A criopreservação de embriões, tanto em biotérios quanto em instituições de pesquisa, é uma poderosa ferramenta. Por meio da manipulação de embriões (em todos os seus níveis), pode-se interferir em diversos protocolos experimentais, sendo que em alguns deles esta tecnologia é absolutamente indispensável. Além desses aspectos, em nosso dia-a-dia nos deparamos, sem nos darmos conta, com outros benefícios advindos dessa tecnologia. Vejamos alguns exemplos:

• Testes de Toxicidade (Efeitos Embriotóxicos)

Consiste na utilização de embriões para a observação do caráter toxicológico de diferentes drogas. Um exemplo é seu emprego no teste de produtos (novos ou não) que serão utilizados na agricultura.

• Caracterização Toxicológica de Fármacos (Teratogênicos)

Certas drogas podem alterar o desenvolvimento normal de organismos. Tais drogas são chamadas 'teratogênicas' e a importância de seu reconhecimento se evidencia ainda mais quando de seu uso em gestantes. Utilizando a tecnologia de manipulação de embriões, pode-se prevenir efeitos indesejáveis de uma droga, primeiramente no embrião e, posteriormente, no próprio feto.

• Medicina Humana Aliada à Reprodução

Ensaios com embriões, utilizando diferentes protocolos, podem auxiliar em programas de reprodução humana como a fertilização *in vitro,* bem como na análise embrionária de distúrbios fetais, entre outros.

A Tecnologia de Manipulação de Embriões Aliada à Produção de Transgênicos e Quimeras

Algumas Considerações Históricas

Na década de 60 do século XX, Kristof Tarkowski utilizou blastômeros para a quebra da zona pelúcida, visando ao desenvolvimento da primeira quimera. Beatrice Mintz propôs um novo processo e obteve sucesso na digestão da zona pelúcida de um embrião. Finalmente, Gardner conseguiu injetar células isoladas de embriões doadores em blastocistos hospedeiros (quimera).

Rudolf Jaenich e Beatrice Mintz, na década de 70, executaram a primeira introdução direta de material genético em embriões de camundongos, munindo-se do DNA do vírus SV-40. Paralelamente, ocorreu a

diversificação no uso das quimeras, sendo que essa utilização se estendia a estudos imunológicos, padrões de pigmentação, diferenciação sexual e estudos de diferenciação celular, entre outros.

A década de 80 foi marcada pela microinjeção de gene clonado (no caso o gene tk do vírus da herpes simplex) em fibroblasto cultivado, possibilitando, assim, a manipulação de material para introdução posterior e influenciando na concepção do transgênico. Ainda nesse período, Gordon executou a microinjeção do gene clonado em pró-núcleo de embriões de uma célula, aproximando-se da transgênese como estabelecida atualmente.

Matéria-Prima para o Desenvolvimento de Modelos Especiais

A abordagem da utilização de tecnologias de manipulação de embriões em pesquisa é deveras ampla. Com elas, podem ser manipulados desde embriões de uma célula até indivíduos em estágio de blastocisto, permitindo, dessa forma, a produção de transgênicos, *knockouts* e quimeras, entre outros.

A 'transgenia' é uma ferramenta científica que possibilita a criação de novos modelos. Esse processo se dá tanto pela microinjeção de fragmentos de DNA em um dos pró-núcleos (Fig. 2) quanto pela produção de quimeras formadas a partir da incorporação de células de uma outra linhagem no blastocisto, de uma linhagem receptora. As células em questão pertencem à massa celular interna (MCI) de um embrião da linhagem doadora e serão introduzidas na blastocele do embrião receptor. Após serem incorporadas, as características da linhagem doadora serão manifestadas na linhagem receptora. Assim sendo, indivíduos originados por essa técnica terão informações genéticas das duas linhagens. É possível, portanto, que o animal apresente em seu tecido somático heranças de duas origens genéticas diferentes (Fig. 3).

Há ainda uma técnica que consiste na fusão das duas técnicas anteriores para a obtenção de transgênicos. Por meio dessa técnica os animais quiméricos serão selecionados após a diferenciação celular, sendo o enfoque principal destinado àqueles cuja característica desejada esteja presente nas células reprodutivas (gametas) (Fig. 4).

Figura 2 – Desenho da transgênese por microinjeção

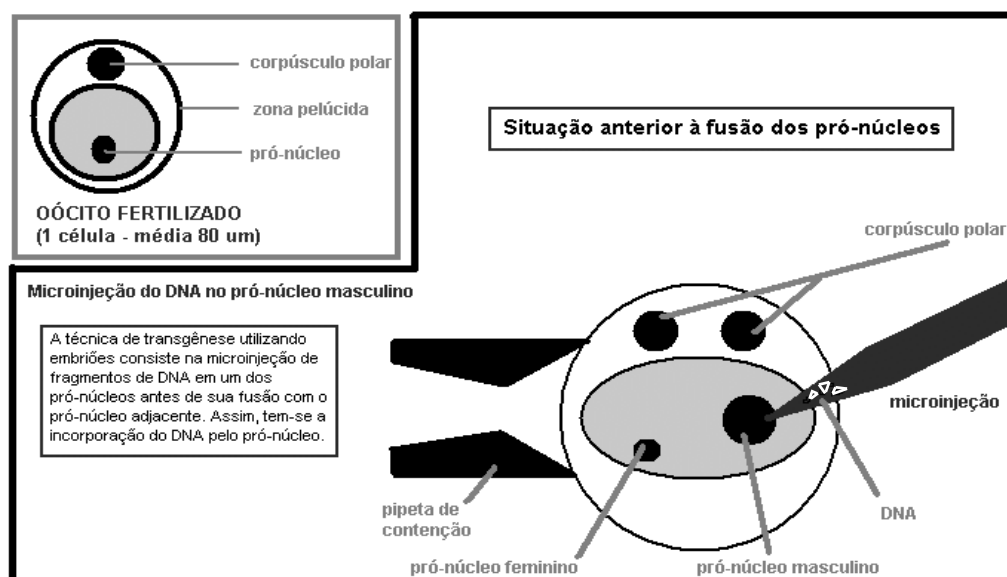



Figura 3 – Confecção da quimera

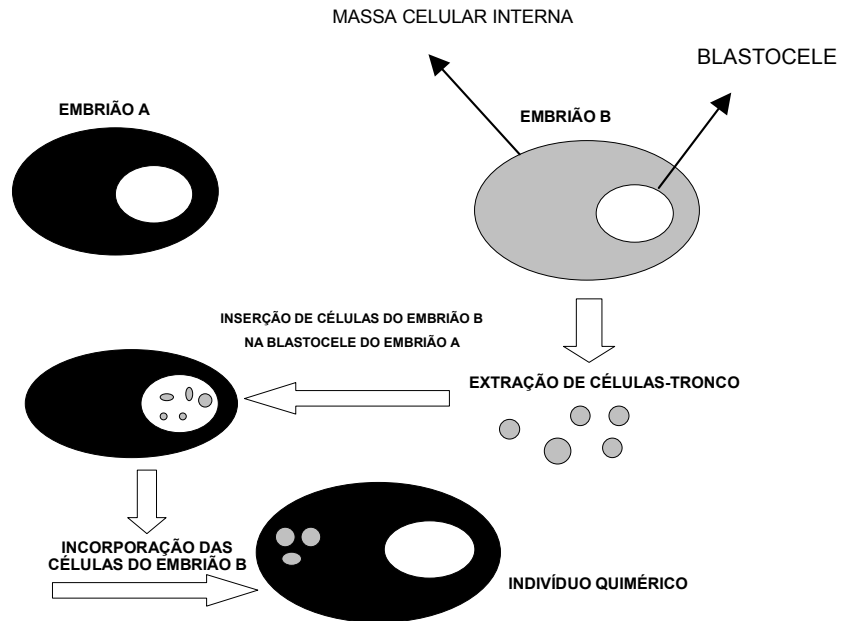



Figura 4 – Confecção de uma quimera utilizando a transgênese para a obtenção de animais com células germinativas geneticamente alteradas

Blastocisto

Blastocele

Passo I
Retirada de células da M.C.I.

Passo II
Eletroporação

Passo III
Injeção na blastocele

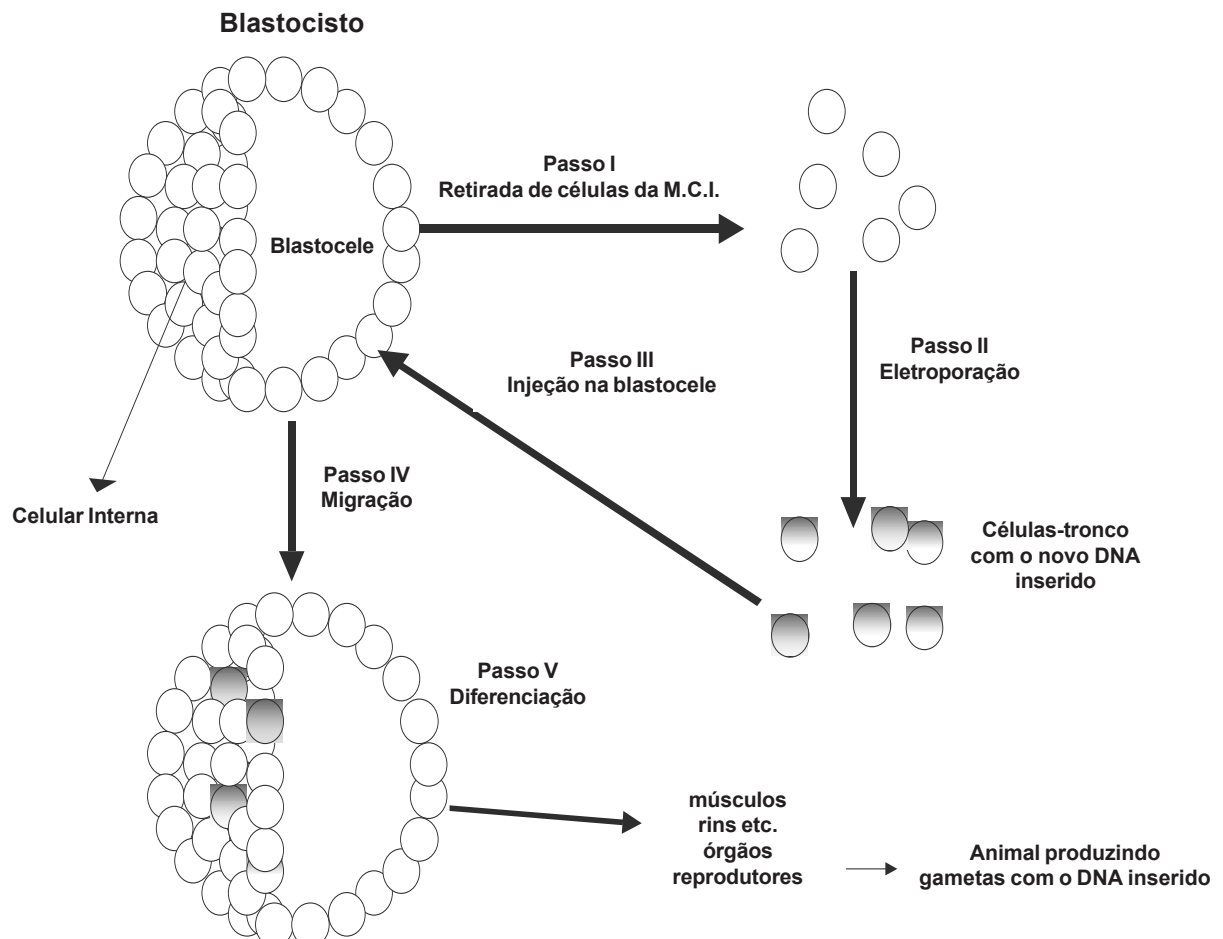
Células-tronco
com o novo DNA
inserido

Celular Interna

Passo IV
Migração

Passo V
Diferenciação

músculos
rins etc.
órgãos
reprodutores

Animal produzindo
gametas com o DNA inserido

A Tecnologia de Manipulação de Embriões e a Produção de Modelos Animais Geneticamente Modificados: quimeras, transgênicos e *knockouts*

A instalação de laboratórios de manipulação de embriões em Centros produtores de modelos animais, além de possibilitar importantes vantagens como o banco de embriões (perpetuação dos padrões sanitários e genéticos originais dos animais) e a descontaminação para agentes de transmissão vertical (como no caso de alguns vírus), também se mostra essencial nas etapas de produção de animais de laboratório geneticamente modificados.

Esses animais geneticamente modificados podem nos fornecer modelos especiais para pesquisas específicas, permitindo, por exemplo, que se estude os efeitos funcionais do produto de um gene específico. Isso é possível uma vez que um camundongo transgênico pode apresentar diferentes características, como super expressar o gene em um tecido específico (permitindo a sua análise *in vivo*), ou até mesmo impedir que um determinado gene se expresse constituindo-se em um modelo *knockout* para um outro.

Nessa parte do capítulo, iremos discutir objetivamente a aplicação da tecnologia de manipulação de embriões na obtenção de modelos.

Para se criar um camundongo transgênico, uma seqüência de DNA, diferente daquela já existente na célula, é introduzida. Esta 'nova' seqüência é conhecida como estrangeira, e pode ser de diferentes origens.

A introdução pode ser realizada por diferentes métodos, dependendo dos objetivos. A mais divulgada e conhecida é a utilização de um micromanipulador que permite uma microinjeção em um dos pronúcleos de óvulos fertilizados (ovos). (Fig. 2).

Após essa injeção, os ovos são implantados em ovidutos de fêmeas receptoras pseudoprenhas, de forma que se desenvolva uma gestação normal. Normalmente, a taxa de sucesso é muito baixa, mesmo com a injeção de algumas centenas de cópias de um determinado gene. A literatura registra o índice máximo de 25% dos animais nascidos serem transgênicos para as cópias inseridas.

As cópias do transgene, na quase totalidade das vezes, são inseridas em sítios aleatórios de cromossomos e transmitidas como uma herança mendeliana simples. O fato da integração usualmente ocorrer antes da replicação do DNA permite que cerca de 75% dos neonatos transgênicos portem o transgene em todas as suas células, incluindo as células germinativas (reprodutoras). Dessa forma, os camundongos 'fundadores', que carregam o transgene em heterozigose, podem ser programadamente acasalados, segundo a conveniência dos pesquisadores.

Talvez a maior contribuição dos animais transgênicos seja o fato de que a tecnologia de transgênese permite que se estude a expressão de genes em um tecido específico. Isto é factível, uma vez que se pode ligar seqüências codificadoras do gene, que se pretende estudar, a seqüências regulatórias responsáveis por sua expressão em um tecido (do órgão a ser pesquisado).

Atualmente, os transgenes podem também ser expressos segundo um estímulo externo causado, por exemplo, por uma droga ou por hormônios. Nesse caso, utilizam-se promotores capazes de responder a esses agentes.

Outro método muito poderoso na produção de modelos animais geneticamente modificados é a manipulação de genes visando à produção de animais *knockouts* (os animais recebem esse nome em virtude de terem um gene inativado, 'nocauteado').

O animal *knockout* possui um gene alterado intencionalmente, de forma que ele não funcione (em decorrência a uma disruptura), ou é o produto de sua expressão que está muito diferente e por esta razão também não funciona (alteração na sequência do gene – mutação). Em ambos os casos, o animal não apresentará um padrão de normalidade para o gene, permitindo estudos mais detalhados de sua função *in vivo*. Uma técnica muito utilizada na produção de animais *knockout* é a recombinação homóloga.

Recombinação Homóloga

Por meio dessa técnica, a integração de uma determinada seqüência introduzida na célula passa a ser parcialmente dirigida. Isso é possível sempre que se conheça a seqüência de bases do gene que se quer inativar na célula receptora. Para tanto, a seqüência do DNA que será introduzida sofre modificações em laboratório (conhecidas como construção), que permitem sua recombinação, por homologia, à seqüência presente no gene-alvo endógeno, podendo substituí-lo.

Os materiais utilizados, nesse protocolo, são as células-tronco (ou células embrionárias pluripotentes, também conhecidas como *stem cells*), normalmente extraídas de embriões na fase de blastocisto. Essas células são manipuladas para a inserção da seqüência de DNA, e uma das metodologias muito utilizada é a eletroporação. O eletroporador é um aparelho que abre minúsculos poros na membrana celular, permitindo a entrada do fragmento de DNA. Após a introdução do DNA, as células tratadas são selecionadas com o intuito de separar aquelas que sofreram recombinação homóloga.

O pesquisador Mario Capecchi e seus colaboradores, da Universidade de Utah, nos Estados Unidos, descreveram, em 1986, um método bastante eficiente e ainda muito utilizado para a identificação e seleção das células recombinantes. Esse método é conhecido como 'dupla seleção' e se fundamenta na expressão de *genes repórter* dentro e ao lado da construção gênica.

O método se baseia no fato da construção apresentar seqüências homólogas àquelas presentes no genoma receptor nos dois lados do gene que se quer inativar (por exemplo, o gene 'K'). Dentro das seqüências homólogas, é ligada ao gene 'K' e também a um gene que dá resistência ao antibiótico, a neomicina (gene 'Neo').

No lado de fora dessa região, que contém as seqüências de homologia e também o gene 'Neo', é colocado um outro gene, o gene da timidina quinase (gene 'tk'). Após a transfecção em um eletroporador (conforme escrito acima), as células são cultivadas em meio de cultura. Nesse meio, é colocado o antibiótico neomicina (ou um análogo dele, o G418) para que as células possam ser selecionadas. Das células colocadas no meio, apenas aquelas que integraram o gene 'Neo' de forma estável em seu genoma sobreviverão, pois serão resistentes ao antibiótico. As demais células morrerão. Esse processo é conhecido como 'seleção positiva'.

As células sobreviventes são então cultivadas em outro meio que contém uma droga denominada ganciclovir, cuja função é matar as células nas quais o gene 'tk' está se expressando. Esse processo é conhecido como 'seleção negativa', e se baseia no fato de que quando a recombinação ocorreu ao acaso (e por esta razão não é homóloga), o gene 'tk' permaneceu ligado ao gene 'K', e as células puderam, então, ser selecionadas.

As células que sofreram recombinação homóloga perdem o gene 'tk', pois ele não está na região de homologia. As células sem o gene 'tk' não morrem na presença de ganciclovir, podendo ser cultivadas, antes de serem introduzidas, no embrião (quimérico) que será implantado nas fêmeas receptoras pseudoprenhes (Fig. 5).

Figura 5 – Esquema para a produção de modelos por recombinação homóloga

Genoma (receptor)
A
K
B
Regiões de homologia (A e B)
Construção
A
K
Neo
B
TK
Eletroporação
Células-tronco
Eletroporado
+ -
Recombinação homóloga (gene-alvo)
Recombinação ao acaso (outro ponto do genoma)

Células-tronco com inserção correta
Células-tronco sem inserção
Células-tronco com inserção aleatória

Perda de TK
A
K
Neo
B
A
K
Neo
B
TK

Seleção positiva com Neomicina (morte das células sem inserção)

Seleção negativa com *Ganciclovir*
(morte das células com inserção aleatória)

Células com inserção correta sobrevivem
Injeção no Blastocisto

Implante em fêmeas pseudoprenhes
Seleção da prole e acasalamento programado
Obtenção de animais homozigotos

Banco de Embriões

Reposição Imediata das Linhagens

O banco de embriões já é uma realidade em alguns biotérios e, dada a sua simplicidade, deveria ser de uso rotineiro em todas as instituições. Com essa ferramenta, pode-se oferecer toda a segurança às colônias, uma vez que possibilita a reposição imediata das linhagens.

As colônias de fundação estão sujeitas a acidentes que não podem ser totalmente evitados, mesmo com programas de prevenção. Assim sendo, faz-se necessária uma técnica que permita a sua reposição. Na década de 80, no The Jackson Laboratory, localizado em Bar Harbor, Maine, nos Estados Unidos, um incêndio acabou por dizimar uma grande parte das matrizes lá existentes. Porém, devido a um banco de embriões completo e funcional, os pesquisadores puderam restabelecer as colônias sem maiores conseqüências para o funcionamento do centro.

Além do prejuízo decorrente da perda de matrizes, os acidentes em biotérios podem comprometer as atividades de pesquisa que utilizam os modelos fornecidos por eles, gerando graves conseqüências. Por essa razão, a reposição imediata das colônias é muitas vezes a única alternativa para minimizar tais efeitos negativos. Com o auxílio de um banco de embriões funcional e operante, é possível o repovoamento rápido e eficiente das colônias.

Perpetuação de Padrões Genéticos e Sanitários

Uma outra grande vantagem no estabelecimento de um banco de embriões é a perpetuação dos padrões sanitários e genéticos. Através desse banco, linhagens podem ser conservadas em nitrogênio líquido, preservando, assim, suas características originais sem que haja perigo de interferência por contaminações genéticas ou sanitárias.

A contaminação genética ocorre por meio da propagação de um gene não original dentro de uma linhagem mantida no biotério. Isso pode ser conseqüência de falhas humanas ou materiais, que permitem o escape de um animal de sua gaiola e sua entrada em outra com animais de linhagem diferente. A ocorrência da cópula irá certamente definir uma progênie geneticamente contaminada. Isso é ainda mais grave nos casos em que duas linhagens de constituição genética diferente, mas de mesma aparência (fenótipo), são mantidas juntas em uma mesma sala. Nesse caso, a progênie não poderá ser diferenciada pela coloração e, portanto, a contaminação terá grande chance de se incorporar na colônia, descaracterizando-a. Do mesmo modo, uma contaminação sanitária (por vírus, fungos, bactérias, protozoários, por exemplo) também irá causar a descaracterização da linhagem.

Ambas as contaminações comprometem a reprodutibilidade e a universalidade experimentais. A universalidade define a propriedade de um resultado obtido ser válido em qualquer centro de pesquisa, desde que realizado com o mesmo modelo animal e nas mesmas condições. Já a reprodutibilidade representa a garantia de que o resultado experimental será o mesmo se repetido em épocas diferentes, utilizando o mesmo modelo nas mesmas condições. O advento do banco de embriões viabilizou essas metas.

Estoque Potencial de Linhagens

A manutenção de diversas linhagens em um biotério é, muitas vezes, um desejo justificável da comunidade científica, uma vez que permite o desenvolvimento de vários ensaios experimentais. Entretanto, isso é muito caro e exige a adoção de diversas outras providências, tais como capacitação de recursos humanos, além da adequação dos espaços físicos (algumas vezes por exigência técnica da própria linhagem) e dos insumos básicos para a manutenção dos animais. Os embriões do banco não possuem tamanhas necessidades, bastando-lhes um suprimento de nitrogênio líquido para que permaneçam congelados.

Assim, o estabelecimento do banco permite ao biotério a manutenção de um grande número de linhagens a baixo custo. Além disso, pode-se otimizar a programação de entrega de animais à comunidade usuária. Certas linhagens, por permanecerem durante muito tempo sem solicitação de uso, são criopreservadas, podendo ser descongeladas e reimplantadas no Centro, caso haja a necessidade.

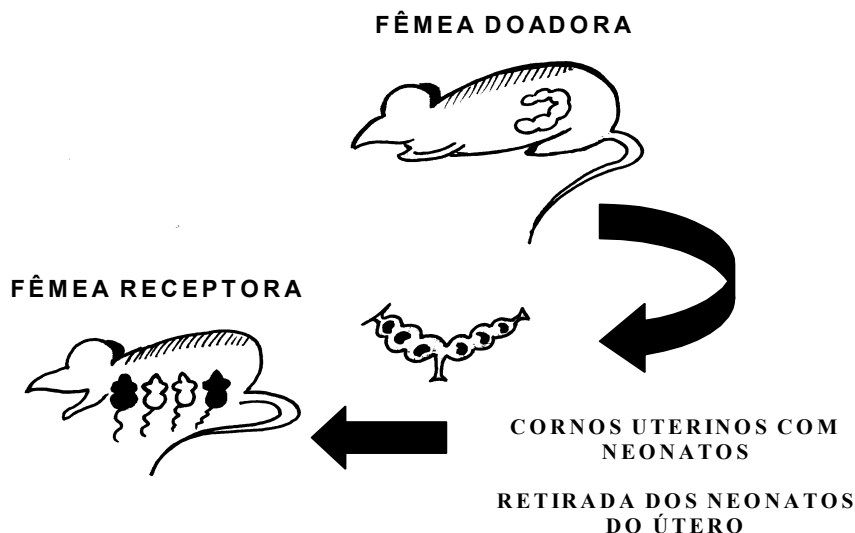
Descontaminação

Auxílio à Técnica de Derivação Cesariana

A técnica de derivação cesariana vem sendo amplamente utilizada como forma de suporte a programas de erradicação de patógenos em colônias contaminadas de camundongos e ratos. Também chamada de histerectomia (Fig. 6), é um procedimento bastante simples, porém de relativa eficiência, uma vez que nos casos de contaminação por patógenos de transmissão vertical (como alguns vírus e micoplasma, por exemplo), o sucesso na eliminação total do agente pode ser comprometido. Isso ocorre porque alguns patógenos atravessam a barreira placentária e contaminam o feto ainda em desenvolvimento no útero materno.

Quando associada a programas de coleta, lavagem e transferência de embriões, o número de casos bem-sucedidos de descontaminação por esses agentes aumenta significativamente. A zona pelúcida do embrião é uma barreira de proteção deveras eficiente e, durante a execução do protocolo, as repetidas lavagens, as quais os embriões são submetidos, retiram por arraste os contaminantes aderidos a ela.

Assim, a obtenção de colônias *virus-free* e axênicas é assegurada com a execução de uma ou duas histerectomias, seguida de acasalamentos programados para a coleta e transferência de embriões em fêmeas receptoras, comprovadamente livres de patógenos.

Figura 6 – A técnica de histerectomia ou derivação cesariana

Transporte Facilitado

Pode-se, com o apoio dessa tecnologia, transportar com segurança e facilidade um grande número de embriões de diferentes linhagens e espécies de animais reduzindo-se, portanto, custos e problemas relacionados ao transporte de animais em maior volume ou de grande porte.

Redução de Custo das Colônias de Fundação

Em centros que produzem animais sanitária e geneticamente certificados, o custo da manutenção das colônias de fundação é muito elevado. Esse fato é decorrente dos cuidados necessários para a manutenção desses animais (acasalamentos, isolamento, alimentação, controle de qualidade etc.). Por meio do estabelecimento do banco de embriões, o número de casais necessários nas colônias de fundação é drasticamente reduzido, acarretando uma redução nos custos dessas matrizes.

Treinamento de Pessoal

Finalmente, uma consideração cabível é a importante contribuição dessa tecnologia para a equipe de técnicos. O contato com esse trabalho, aparentemente sofisticado, tem efeito estimulante sobre a equipe, que se sente muito valorizada.

Principais Etapas da Tecnologia de Criopreservação

O estabelecimento de uma rotina para o congelamento de embriões acontece em várias etapas e apresenta diferentes necessidades. Para melhor compreensão, nós as separamos em duas partes.

Parte 1

Necessidades Gerais (preparo dos materiais, drogas e animais)

Para a realização da técnica, é indispensável o preparo de alguns itens.
Dentre eles destacam-se os seguintes materiais:

- meios de coleta e cultivo (Brinster, PB1, M16, Whiten etc.)
- machos vasectomizados
- fêmeas doadoras (superovulação e acasalamento normal);
- hormônios (estimulante de folículos e luteinizante)
- drogas e anestésicos
- materiais cirúrgicos

Parte 2

Coleta de Embriões
Os embriões são a matéria-prima utilizada para a formação do banco. Sua obtenção é o princípio de todo o processo e exige os seguintes materiais:

- preparo do meio de coleta (podem ser utilizados diferentes meios, como PB1 e Han F10)
- preparo dos capilares de manipulação
- seringa e agulha para a lavagem do oviduto
- placas de Petri descartáveis
- tesouras de ponta romba e fina
- pinças
- fêmeas doadoras (acasaladas de forma programada com ou sem superovulação)

Congelamento
A etapa de congelamento dos embriões é, a despeito da simplicidade, extremamente crítica. A qualidade do meio utilizado, associada ao preparo dos materiais, determina o sucesso no congelamento, preservando a viabilidade dos embriões. Nessa etapa, a atenção deve ser para os seguintes materiais:

- preparo dos meios de congelamento. Esses meios são obtidos a partir da solubilização de substâncias crioprotetoras no meio de coleta (podem ser utilizadas diferentes substâncias para a proteção dos embriões, como DMSO, propileno glicol etc.);
- preparo de micro capilares de manipulação;
- preparo dos minitubos para acondicionamento dos embriões em meio a solução crioprotetora (existem diversos modelos disponíveis; é fundamental que possam ser rotulados);
- disposição dos embriões nos minitubos e transferência destes para o banho refrigerado;
- transferência dos minitubos para os reservatórios (contêineres) com nitrogênio líquido.

Descongelamento
De certa forma, juntamente com o cultivo, esta etapa monitora as anteriores. No descongelamento, os embriões receberam um tratamento que permitira o retorno a mesma situação biológica que se encontravam logo após a sua retirada do interior do oviduto da fêmea doadora. Esse tratamento consiste na colocação de um mesmo volume de um meio, sem crioprotetor (isotônico), ao meio recém-extraído do minitubo e que contém os embriões. Esse procedimento visa a diluir o crioprotetor, pois, na temperatura ambiente, o mesmo é tóxico e compromete a viabilidade dos embriões. Após três diluições seriadas, os embriões podem ser transferidos para um meio de cultivo isotônico.
- retirada dos minitubos do reservatório: para descongelamento dos embriões;
- deposição dos embriões em meio de cultura (reidratação);
- cultivo de embriões em estufa de CO_2, pelo período de 12h a 14h, na temperatura de 37 ºC e percentual de 4,5% de $CO_{2;}$
- observação dos embriões descongelados;
- transferência de embriões para as fêmeas receptoras pseudoprenhes.

Implante
Após o descongelamento, o cultivo ou mesmo quando se deseja realizar uma transferência a fresco para descontaminação, os embriões deverão ser introduzidos na fêmea receptora preparada para recebê-los. Este preparo é a indução de uma pseudoprenhez na fêmea receptora, obtida a partir de sua colocação junto a um macho vasectomizado. Isto possibilita que a fêmea desenvolva uma fisiologia similar àquela observada na gestação normal, garantindo aos embriões um ambiente próximo ao observado nesse tipo de gestação. O local onde os embriões serão introduzidos é o mesmo de onde eles foram retirados: o oviduto. Nessa etapa da técnica, devem ser adotadas as seguintes providências:
- anestesia da fêmea receptora (preferencialmente híbrida) previamente acasalada com o macho vasectomizado;
- incisão para a exposição do corno uterino, com posterior apresentação do oviduto;
- ruptura da bolsa ovariana e introdução dos embriões via *infundibulum*;
- retorno do corno uterino e do oviduto à cavidade peritonial;
- suturas no peritônio e pele;
- acompanhamento pós-cirúrgico e posterior detecção de prenhez.

OBS.: Os processos anteriormente citados fazem parte de um protocolo que deve ser fielmente seguido, sob pena de não se evitar fatores de interferência, que podem comprometer a eficácia da técnica.

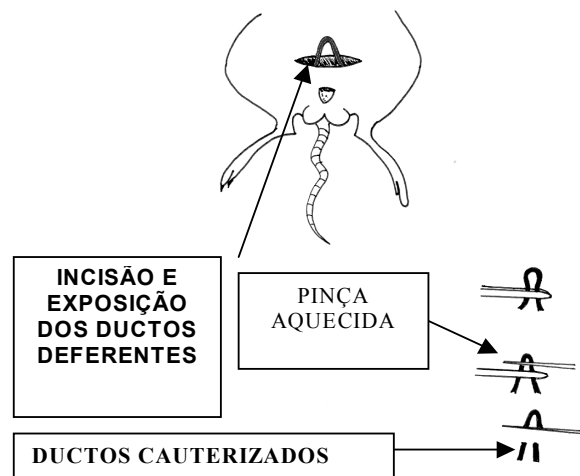
O Detalhamento das Etapas Utilizando como Exemplo o Camundongo

Preparo de Machos Vasectomizados

Para descrever o processo de vasectomia, inicialmente devemos apresentar os materiais utilizados. Empregaremos o camundongo como modelo.

- INSTRUMENTAL CIRÚRGICO – composto de tesoura de ponta romba, tesoura de ponta fina, pinças relojoeiro e de ponta romba, bisturi, tesouras porta-agulha, agulhas para sutura, linha de algodão para sutura, linha absorvível para sutura do peritônio, agulhas e seringas para anestesia;
- SUBSTÂNCIA ANESTÉSICA – pode variar de acordo com a espécie animal com a qual se está trabalhando. Para camundongos, utiliza-se preferencialmente o *Avertin* (2-2-2-tribromoetanol diluído em álcool amyl terciário);
- MATERIAL PARA CAUTERIZAÇÃO DO DEFERENTE – composto por uma pinça relojoeiro e uma lamparina;
- MATERIAL PÓS-OPERATÓRIO – consiste de uma fonte de calor (podendo ser uma lâmpada incandescente) e de uma caixa individual, para o animal, com comida e água. A cama utilizada deverá ser de papel ou material similar para o aumentar o conforto do animal e reduzir o estresse pós-cirúrgico.

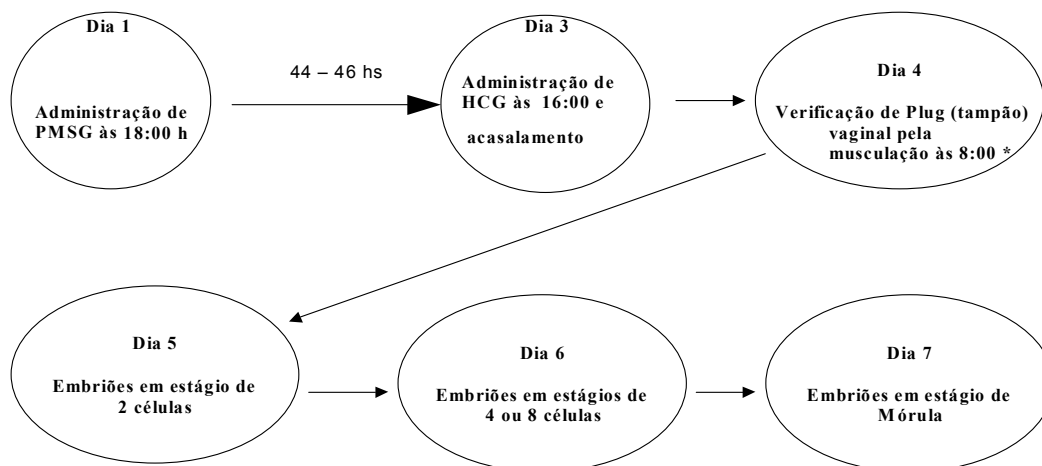
Desse modo, munindo-se do material acima citado, pode-se partir para a cirurgia. Inicialmente, administra-se o anestésico no animal via intraperitonial, a fim de sedá-lo. Faz-se então uma incisão no abdômen, a aproximadamente 1 cm acima do pênis. Utilizando as pinças de ponta romba, resgata-se o ducto deferente e, com a pinça relojoeiro, previamente aquecida, procede-se com a cauterização. O testículo é então forçado a retornar à posição anatômica, fazendo-se uma pequena pressão com os dedos indicadores sobre o abdômen, de forma a permitir que o testículo retorne à bolsa escrotal. O mesmo procedimento é utilizado no outro deferente. Finalmente, sutura-se o peritônio e a pele, e o animal é transferido para uma gaiola próxima a uma fonte de calor. O camundongo é então acompanhado em seu pós-operatório pelo período mínimo de dois dias (Fig. 7).

Figura 7 – Desenho esquemático da cauterização do deferente

Preparo da Fêmea Doadora

A fêmea doadora de embriões geralmente é oriunda das colônias de fundação e por esta razão apresenta um custo elevado. A otimização de seu acasalamento é, portanto, bastante desejável. Para atingir um grau máximo de aproveitamento reprodutivo, são utilizados hormônios sexuais que induzem a fêmea a um ciclo exógeno.

Sob o efeito dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), um número bastante elevado de óvulos é produzido e liberado para estarem disponíveis à fecundação. Normalmente, a dose de 5 UI é suficiente para a produção de um elevado número de embriões. Entretanto, em virtude da constituição genética do camundongo (linhagem), certos ajustes se fazem necessários.

Essa etapa do processo (estimulação da fêmea via hormônios), também chamada superovulação, é apresentada na figura seguinte.

Figura 8 – Etapas do processo de superovulação

(*) No caso de ratos, a confirmação da cópula se dá pela procura de espermatozóides em lavagem da vagina da fêmea com solução PBS e observação em microscópio.

Coleta de Embriões

Após o processo de superovulação, a fêmea é colocada na presença do macho para que a cópula se processe e os embriões possam ser coletados. Diferentes estágios de desenvolvimento embrionário podem ser utilizados. Porém, os mais utilizados, tanto para congelamento quanto para o implante, são os embriões de 2 a 8 células. Esses estágios são conhecidos como pré-implantação e estão ainda no interior do oviduto, migrando em direção ao útero onde a gestação se desenvolveria (Figs. 9 e 10).

Figura 9 – Estágios de pré-implantação na embriogênese de camundongo

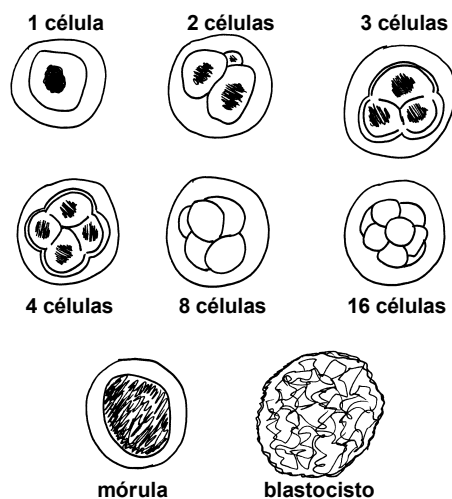
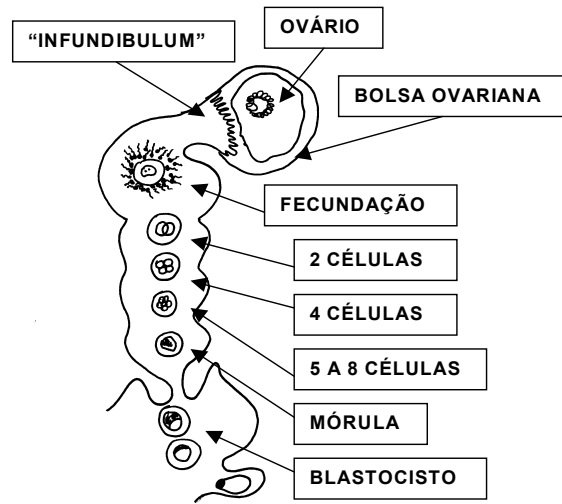
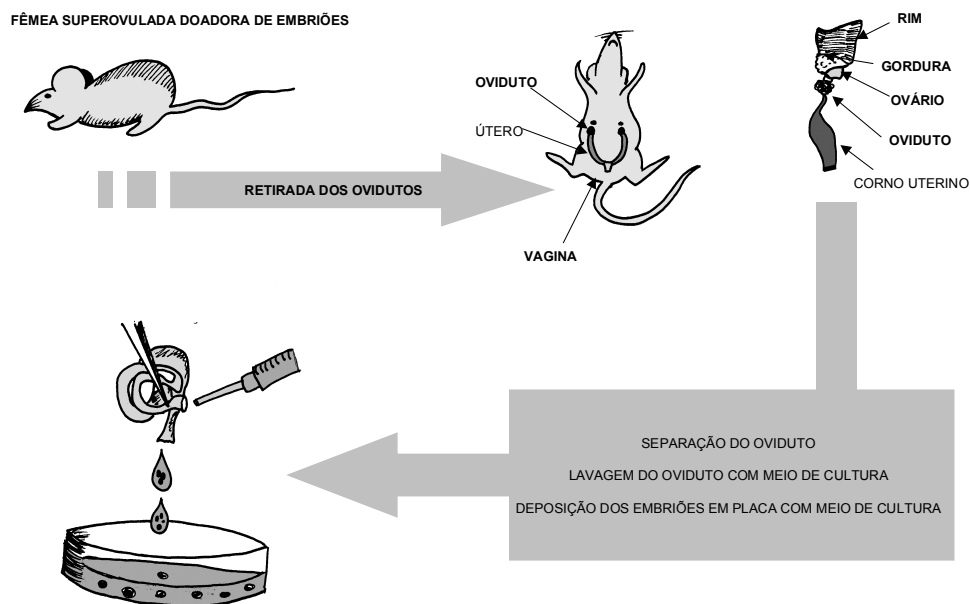



Figura 10 – Estágios de desenvolvimento de embriões no oviduto

Para a coleta dos embriões presentes no interior do oviduto, são necessários os seguintes materiais:

· INSTRUMENTAL CIRÚRGICO – tesouras ponta romba e ponta fina, pinças ponta romba e relojoeiro, seringa e agulhas especiais para a lavagem do oviduto a partir do infundíbulo com injeção de meio de cultura;
· INSTRUMENTAL DE COLETA – capilares de manipulação, placas de Petri estéreis, meio de coleta.

A técnica de coleta (Fig. 11) acontece como se segue:

· sacrifício da fêmea normalmente executado por deslocamento cervical, uma vez que esse método é rápido e indolor, além de não causar maiores danos aos embriões. Certas drogas, uma vez presentes na circulação, podem atravessar a barreira placentária e causar danos aos embriões, comprometendo a sua viabilidade;
· abertura da pele e do peritônio para o resgate dos cornos uterinos, em cuja extremidade se encontra o oviduto;
· retirada do oviduto com um tesoura de ponta fina;
· lavagem do oviduto com o meio de coleta.

Figura 11 – Diagrama esquemático das etapas de coleta

Terminado o processo acima descrito, os embriões coletados são avaliados quanto as suas características morfológicas e separados para um dos três procedimentos: transferência a fresco, congelamento e cultivo de embriões.

Transferência a Fresco

É a técnica recomendada para substituir a histerectomia tanto para a obtenção de animais axênicos quanto para a descontaminação de colônias comprometidas.

Em ambos os casos, os embriões coletados são transferidos para diferentes placas com meio de coleta. Essa transferência é seriada, constituindo-se de passagens sucessivas de uma placa a outra. A técnica permite que a superfície do embrião (zona pelúcida), seja 'lavada', retirando-se, por 'arraste mecânico', patógenos que estejam em sua superfície. Após a terceira passagem, e uma vez 'limpos', os mesmos são recolhidos e implantados em fêmeas receptoras isentas de patógenos.

Cultivo de Embriões

O cultivo é feito por meio da seleção de embriões e da sua posterior transferência para uma placa contendo meio apropriado. A placa com os embriões é colocada em uma estufa de CO_2 com os seguintes parâmetros de ambiente:

- 4% a 5% de CO_2
- temperatura de 37 °C
- umidade relativa de 90%

Os embriões serão observados por um período de 12 a 14 horas para que seu desenvolvimento possa ser acompanhado. Desse modo, pode-se obter a certificação das rotinas adotadas, da qualidade dos meios de cultura etc. Pode-se também fazer análises dos ajustes na técnica de acordo com as exigências das diferentes linhagens.

Um dos maiores indicadores da eficiência da rotina utilizada é a porcentagem de embriões que conseguem se desenvolver. Entretanto, para essa análise, devem ser utilizados embriões de 2 ou 4 células, preferencialmente oriundos de linhagens, cujos resultados anteriores sejam bem estabelecidos e sirvam como controle.

Congelamento de Embriões (Fig. 12)

Os embriões coletados são submetidos ao processo de congelamento para que possam ser estocados em botijões com nitrogênio líquido (contêineres), constituindo assim o banco de embriões. Como já foi discutido, os representantes das linhagens estarão com sua condição original preservada, ou seja, livres de patógenos, contaminações ou de deriva genética. Em condições normais de estocagem, o nitrogênio líquido do botijão atinge uma temperatura de -196 °C. Nessa temperatura, qualquer atividade metabólica do embrião ou de eventuais patógenos é cessada, fazendo com que o banco seja o local mais seguro para a proteção das linhagens.

Para que o congelamento de embriões seja bem-sucedido, é necessário que o meio utilizado os desidrate gradualmente, evitando que a água em seu interior se cristalize (devido as suas pontes de hidrogênio), o que poderia causar a ruptura da zona pelúcida e, conseqüentemente, sua morte. Assim sendo, no processo de congelamento, o embrião é colocado em um meio levemente hipertônico, o qual promoverá uma retirada parcial da água de seu interior em decorrência da diferença no potencial osmótico (a membrana é semipermeável) entre o meio intra e extracelular. A substância adicionada ao meio de cultura do embrião para que esse fenômeno ocorra é chamada de substância crioprotetora.

Diferentes substâncias crioprotetoras podem ser utilizadas, dependendo da espécie animal com que se está trabalhando. Para embriões bovinos, por exemplo, o crioprotetor ideal é o glicerol. Já para embriões humanos e de camundongos, o mais utilizado é o propileno glicol.

Há, basicamente, duas metodologias de congelamento. A primeira delas compreende o congelamento rápido com a colocação dos minitubos nos quais os embriões estão acondicionados em contato direto com o nitrogênio líquido. Esse processo é conhecido como 'vitrificação'. Porém, apesar de apresentar bons resultados no caso de embriões bovinos, a vitrificação pode causar danos a embriões cujas características lhes conferem uma menor resistência (em murinos, por exemplo). Assim, pode-se utilizar uma segunda metodologia, conhecida como 'congelamento gradual', que proporcionará melhores resultados.

No congelamento gradual, também conhecido como por etapas, embriões cuja zona pelúcida é menos resistente terão tempo de perder temperatura sem que ocorra uma ruptura de sua cápsula. Na verdade, no processo gradual, ocorre a perda de água por parte do embrião juntamente com o decréscimo de sua temperatura. Uma vez coletados os embriões, o material necessário para o congelamento gradual é o seguinte:

- MATERIAL DE MANIPULAÇÃO – consiste de capilares de manipulação de embriões (confeccionados por meio do alongamento de pipetas Pasteur previamente aquecidas, de modo a formar um capilar de vidro com diâmetro aproximado de 120 micrômetros), placas de Petri (plásticas descartáveis);
- MATERIAL DE ACONDICIONAMENTO – minitubos próprios para guardar os embriões, botijão com nitrogênio líquido, magazines para o armazenamento de minitubos no interior do botijão;
- MATERIAL QUÍMICO – solução crioprotetora (de concentração conhecida) adequada à espécie utilizada;
- MATERIAL DE CONGELAMENTO – banho refrigerado com controle de temperatura. Os banhos devem ser programáveis e permitir um decréscimo controlado.

O processo de congelamento em etapas (Gráfico 1) inicia-se com a adição da solução crioprotetora ao meio e este ao minitubo. A partir daí, os embriões são retirados da placa contendo meio de cultura e, com o auxílio de um capilar, colocados no interior do minitubo. Este, então, é levado ao banho refrigerado que executará a diminuição gradual da temperatura. Logo, o minitubo estará congelado e poderá então ser colocado no reservatório de nitrogênio líquido, onde poderá ser mantido por tempo indeterminado, desde que o nível de nitrogênio seja periodicamente acompanhado e completado quando necessário.

Gráfico 1 – Temperatura em razão do tempo no congelamento gradual

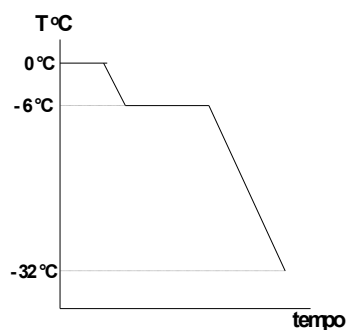
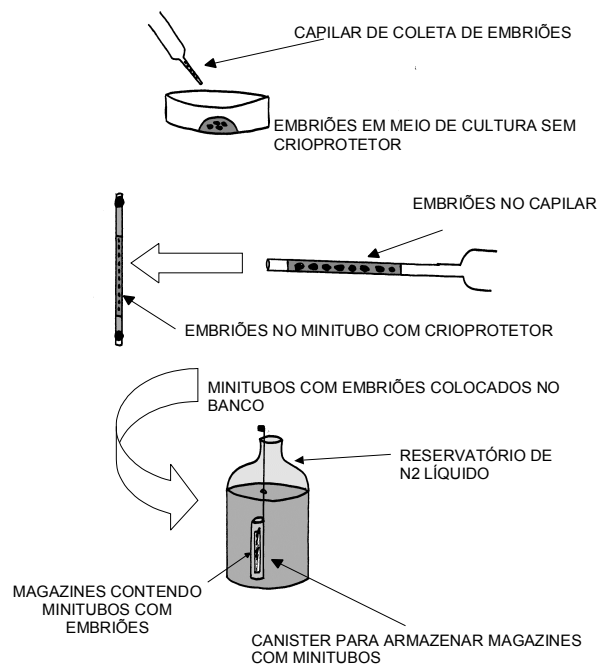
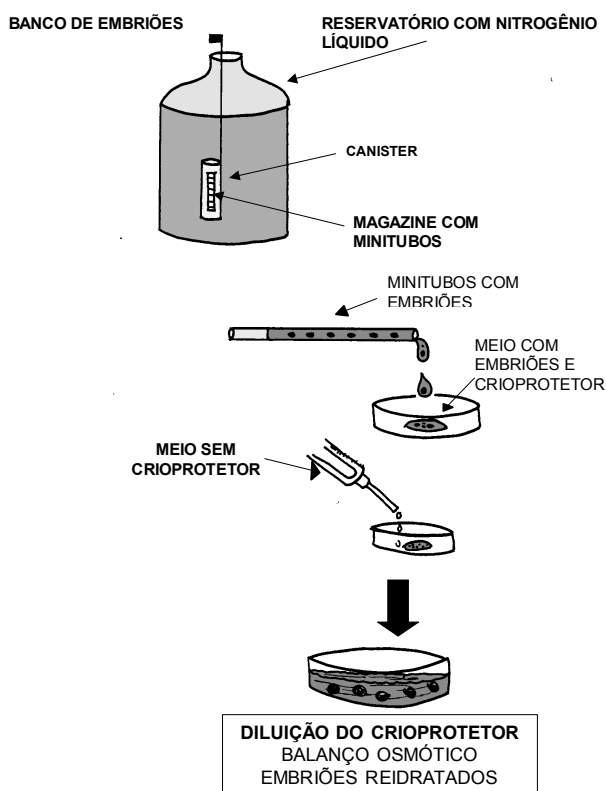



Figura 12 – Esquema da rotina de congelamento de embriões realizada em criopreservação para a formação do banco de embriões

Descongelamento de Embriões

O processo de descongelamento deve ser realizado com cuidados, para não danificar os embriões. O crioprotetor deve ser retirado para que o embrião seja hidratado novamente. Porém, essa reidratação deve acontecer também de uma forma gradual, com o intuito de se evitar que o embrião absorva água em excesso e se rompa.

Para tanto, retira-se o minitubo do reservatório de nitrogênio líquido, esperando até seu descongelamento total (pode-se utilizar uma simples fricção manual para acelerar o processo). Coloca-se o conteúdo do minitubo em uma placa estéril. Finalmente, inicia-se a diluição do crioprotetor em meio de cultura para a restauração do potencial osmótico original do embrião (Fig. 13).

Executado o descongelamento, os embriões poderão ser cultivados ou diretamente implantados em fêmeas receptoras programadas, como será descrito a seguir.

Figura 13 – Procedimento para descongelamento de embriões

Implante de Embriões

Uma das possibilidades de utilização dos embriões descongelados é o implante. Por meio dele, uma fêmea receptora pseudoprenhe recebe embriões de uma doadora.

A pseudoprenhez é alcançada com a colocação da fêmea receptora para que acasale com um macho vasectomizado, conforme já descrito acima. Esse procedimento promove alterações fisiológicas que aumentam o sucesso da técnica.

O implante é um processo cirúrgico bastante delicado e exige os seguintes materiais:

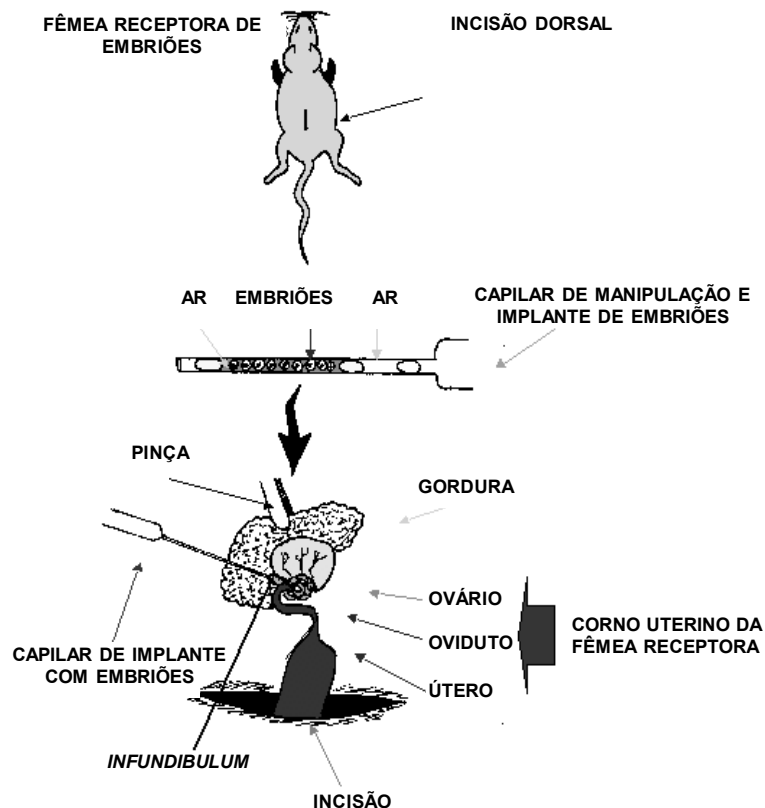
· material cirúrgico – pinças relojoeiro e de ponta romba, tesouras de pontas romba e fina, tesoura porta-agulha, agulha para sutura, linha de algodão para sutura da pele, bisturi, agulha e seringa para administração de anestésico, gaze e filtros de papel;

- SUBSTÂNCIA ANESTÉSICA – preferencialmente deve-se utilizar para camundongos o 2-2-2-tribromoetanol (Avertim) diluído em álcool isoamil terciário, injetado intraperitonialmente;
- MATERIAL PARA MANIPULAÇÃO E IMPLANTE DE EMBRIÕES – placas de Petri plásticas estéreis e descartáveis, capilar de implante (que deve ser mais curto e delgado do que o utilizado para a manipulação);
- MATERIAL PÓS-OPERATÓRIO – fonte de calor (lâmpada incandescente) para o pós-operatório. Acompanhamento da prenhez.

Para a execução do implante (Fig. 14), anestesia-se a fêmea e, então, se faz uma pequena incisão dorsal na altura correspondente aos rins. Utilizando a pinça de ponta romba, após a abertura do peritônio, resgata-se o oviduto, puxando-o pela gordura adjacente. Com as pinças relojoeiro, rompe-se cuidadosamente a bolsa ovariana, expondo o ovário e o infundíbulo. Introduz-se o capilar de implante no início do oviduto (infundíbulo), e se injeta os embriões. Após a devolução da estrutura a sua posição anatômica inicial, a pele deve então ser suturada. O animal é mantido sob observação em separado de outros para a detecção da prenhez.

A técnica do implante precisa é o passo final para o repovoamento de uma colônia de animais que tenha sido exterminada ou contaminada por um patógeno qualquer. Assim, os embriões a serem implantados devem, antes, passar por um processo de análise e seleção, de modo a diminuir insucessos.

Além disso, deve-se observar se o embrião a ser implantado apresenta características condizentes com seu estágio de desenvolvimento. A aparência da zona pelúcida, a posição e o tamanho dos blastômeros e a presença ou não de atividade celular são excelentes indicadores de qualidade embrionária.

Figura 14 – O procedimento de implante de embriões em camundongos

Principais Fatores Limitantes da Criopreservação

Por se tratar de um processo que exige precisão e delicadeza, a criopreservação de embriões está sujeita a fatores de interferência. Os mais importantes são:

- Qualidade dos meios utilizados – deve-se ter um forte controle sobre os meios de cultura e coleta. Assim, a qualidade dos reagentes utilizados é determinante para o sucesso de qualquer técnica que envolva a manipulação direta de embriões. É necessário também um conhecimento das características químicas e biológicas dos meios (pH, osmolaridade, temperatura de acondicionamento etc.);
- Estocagem – os meios devem ser preferencialmente recém-preparados. Nos casos em que isso não é possível, os mesmos deverão ser conservados em *freezer* e em frascos estéreis. Entretanto, sempre se deve considerar a sua 'idade' como um fator de interferência;
- Adequação do meio – o meio de cultura deve ser adequado a espécie de embriões a serem cultivados, bem como ao seu estágio de desenvolvimento. Quando não há conhecimento prévio da eficácia do meio, recomenda-se a execução de ensaios e testes;
- Idade das fêmeas – fêmeas doadoras e receptoras podem ser utilizadas em diferentes idades, dependendo da linhagem ou espécie. Deve-se, porém, ter um conhecimento da fisiologia do animal com que se está trabalhando para adequar a idade à sua utilização;
- Condições de superovulação – fatores como peso e estresse devem ser considerados no momento da superovulação. A superovulação é uma etapa muito crítica para o sucesso da técnica. Sua resposta é diferente entre espécies e muitas vezes dentro da mesma espécie. Como exemplo destacamos a variação no número de embriões, observada entre camundongos isogênicos, porém de linhagens diferentes;
- Escolha do crioprotetor – como já foi dito anteriormente, diferentes espécies respondem de maneiras particulares à ação de um determinado crioprotetor. Cuidados devem ser tomados e protocolos já existentes devem ser consultados;
- Metodologia – tanto no congelamento quanto no descongelamento, a metodologia aplicada é fundamental para a determinação da viabilidade embrionária. Alguns embriões respondem melhor a certas técnicas de congelamento que outros. Assim sendo, deve-se pesquisar em bibliografias adequadas qual é a melhor metodologia a ser aplicada à espécie que se deseja criopreservar;
- Via de implantação – o embrião tem um caminho natural no interior do trato reprodutivo da fêmea. Assim, o local onde o mesmo será implantado dependerá de seu estágio de desenvolvimento. As duas possibilidades são: implante no oviduto ou diretamente no útero;
- Fêmeas receptoras – algumas linhagens respondem melhor ao implante de embriões do que outras. Logo, a seleção das linhagens mais propícias a receber embriões é desejável. Via de regra, a utilização de fêmeas híbridas reduz a interferência do *background* genético, aumentando sensivelmente o número de sucessos.

A Manipulação de Embriões e o Futuro

O futuro da manipulação de embriões é bastante promissor, em todos os aspectos. Por se tratar de um ramo da ciência em pleno desenvolvimento, novas tecnologias vão surgindo a cada dia, e com elas surgem também novas perguntas que exigem respostas.

Atualmente, a manipulação de embriões está amplamente difundida em diversos ramos da economia, como a pecuária, a indústria farmacêutica e nas clínicas de reprodução humana. Com o advento de novas descobertas e tecnologias, a tendência de uma maior propagação e utilização dos processos de criopreservação e de manipulação embrionária é inegável. Ainda assim, há muito o que ser descoberto na área.

A utilização de embriões para a criação de modelos experimentais transgênicos ganha força a cada dia, sendo que o mesmo pode-se dizer no que tange aos processos de clonagem, fertilização etc. Deste modo, o futuro reserva muitos avanços aos bioteristas que escolhem esta área. Porém, deve-se possuir a ética e o discernimento necessários a fim de julgar o impacto das descobertas vindouras para a humanidade.

A ciência é a ferramenta maior de avanços para o ser humano. É a maior geradora de conhecimento de nossa civilização. Porém, esta mesma ciência que salva também pode ser usada para destruir. Será que todos aqueles que estudaram as propriedades do átomo imaginavam que um dia esse conhecimento seria utilizado para a destruição em massa de seres humanos? Daí a necessidade de um julgamento lúcido e ético acerca das necessidades de nosso mundo.

A manipulação de embriões pode ser utilizada um dia para salvar espécies ameaçadas de extinção, para a multiplicação de rebanhos a fim de suprir o crescente aumento populacional e até mesmo para curar doenças. Porém, é necessário ética. Caso contrário, podemos correr o risco de novamente a ciência criar algo do qual posteriormente se arrependerá.

Bibliografia

De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Green, M. *Genetic Variants and Strains of The Laboratory Mouse.* Stuttgart/New York: Ed. Gustav Fischer Verlag, 1979.

Hafez E. S. E. *Reprodução Animal*. Michigan: Manole Ltda., 1982. v. I e II.

Hedrich, H. J. & Reetz, I. C. Cryopreservation of rat embryos. In: *Genetic Monitoring of Inbred Strains of Rats*. Stuttgart/New York: Ed. Gustav Fischer Verlag, 1990.

Hogan, B. et al. *Manipulating the Mouse Embryo – a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

Kawase, Y. et al. Application of the piezo-micromanipulator for injection of embryo stem cells into mouse blastocysts. *Contemporary Topics*, 40(2), 2001.

Nakagata, N. Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice. *Experimental Animal*, 44(1):1-8, 1995.

Reetz, C. et al. *Rederivation of inbed strains of mice by means of embryo transfer*. *Laboratory Animal Science*, 38(6):696-701, 1988.

Silver, L. M. *Mouse Genetics – concepts and applications*. New York: Oxford University Press, 1995.

Sztein, J. M. et al. Mouse sperm cryopreservation protocol. *Cryobiology*, 35:46-52, 1997.

Universities Federation for Animal Welfare (Ufaw). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals.* 6th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1986.

Woo, M. *Pratical Notes on Oocytes Embryo – recovery culture, transfer, fertilization* in vitro *and storage.* MRC Experimental Embriology and Teratology Unit, St. George's Hospital Medical School, London, England, s.d.

A nalgesia em Animais de Experimentação

Ekaterina Akimovna B. Rivera

Introdução

O termo analgesia é, na acepção da palavra, ausência de dor. No homem, dor e analgesia podem ser avaliadas por meio de relatos verbais sobre a sensação sentida; nos animais, estas só podem ser avaliadas indiretamente, por meio de atitudes comportamentais ou de dados fisiológicos.

Para relacionar a dor nos animais com o que é sentido pelo homem, é essencial um pouco de antropomorfismo. Como o termo dor se refere a um estado subjetivo, ele só poderia ser aplicado quando se referisse ao homem. Porém, como o homem e o animal apresentam em comum estruturas neurológicas e processos fisiológicos, e em virtude da existência, em animais, de manifestações comportamentais comparáveis àquelas observadas no homem quando em estado de dor, tornou-se, no mínimo, eticamente prudente aceitar que o sofrimento animal é equivalente ao sofrimento humano quando ambos forem sujeitos a um mesmo fator que induza à dor. Por isso, é essencial que, na ausência ou evidência da dor, se pressuponha que qualquer estímulo ou experiência produtora de dor e desconforto em humanos também cause o mesmo efeito nos animais. Esse 'postulado de analogia' deve ser aceito, a menos que sua invalidade seja provada em casos específicos (Lasa, 1990).

Seria bem melhor se pudéssemos avaliar, com segurança, a dor que sente um animal pelos sinais comportamentais e fisiológicos apresentados. Não há garantias de que se possa reconhecer a dor por meio de comportamentos análogos, porque avaliar a intensidade de estados subjetivos pode não ser o meio mais correto, em razão das diferenças interespecíficas nas relações entre o estado de dor e as manifestações comportamentais influenciadas por vários fatores. Não se pode afirmar que um porco que grita quando contido fisicamente sofre mais do que um animal que morre atropelado, porém calado. Se formos comparar mamíferos com outros vertebrados, como o peixe, ou com invertebrados, as conclusões sobre dor se tornam ainda mais problemáticas.

A redução ou alívio da dor é considerado, por Flecknell (1994), como um aprimoramento no cuidado dos animais. Devemos saber como avaliar e monitorar a dor, se quisermos que os animais sejam tratados humanitariamente e com ética. Além das preocupações éticas, a dor acarreta variáveis indesejáveis à pesquisa, que podem interferir significativamente na interpretação dos estudos. Os pesquisadores e os tratadores de animais devem conhecer o comportamento normal dos animais de experimentação, pois o sucesso ou o fracasso do estudo pode depender da experiência do técnico em observar os animais para poder minimizar a dor (Montgomery Jr., 1987).

Mas, o que é a dor? Todos sabemos o que é, mas achamos difícil defini-la.

A dor é definida (Wolfenhson & Lloyd, 1994) como uma experiência emocional e sensitiva desagradável associada com lesão de tecido, potencial ou real. Outros autores dividem a dor em física e emocional, definindo a primeira como uma percepção evocada por estímulos que lesionam ou que têm a potencialidade de lesar tecidos, excitando nervos específicos – um exemplo é a dor causada por intervenções cirúrgicas, mesmo quando bem conduzidas. A dor emocional em animais pode ser definida como uma reação emocional

desagradável a estímulos internos ou externos que resultam em estado de ansiedade ou frustração, como, por exemplo, níveis de ruídos, incapacidade para controlar seu meio ambiente.

Também não há palavra para diferenciar a dor tolerável da intolerável. É difícil determinar exatamente quando é atingido um nível máximo de dor. O nível de intolerância à dor é aquele em que o animal, se possível, tenta eliminar ou reduzir o estímulo que a causa.

Em lugar de se tentar exaustivamente um conceito indefinível de dor, deve-se simplesmente estudar os esforços do animal para equilibrar seu ambiente interno e, então, ajudá-lo ou pelo menos não nos intrometermos nesses esforços sem razão plausível.

Há várias respostas estereotipadas à dor nos animais, principalmente nos mamíferos. As respostas à dor variam não só entre as espécies, mas também entre indivíduos da mesma espécie.

As respostas à dor se manifestam quando o animal:

· modifica o comportamento consciente para evitar a situação dolorosa (requer função de alto nível do SNC);
· responde automaticamente para se proteger, ou parte de si mesmo, por exemplo, pelo reflexo de retração ou de imobilidade;
· passa a experiência para outros do grupo assegurando, assim, a sobrevivência de alguns indivíduos da população. Isso pode ocorrer por meio de vocalização ou da liberação de feromônios, e pode causar estresse aos outros animais próximos, especialmente se estes não puderem reagir como exigido por seu comportamento normal.

Há vários fatores que modificam a resposta à dor. Estes devem ser considerados quando a dor for avaliada qualitativamente. Dentre outros fatores, podem ser mencionados:

- Dados individuais do animal, tais como espécie, idade e origem. Eles irão influenciar a resposta do animal aos estímulos dolorosos.
- Histórico do animal e do estabelecimento. Considere problemas prévios encontrados, o curso dos problemas atuais, o ambiente onde o animal está alojado, os procedimentos que estão sendo executados e os problemas de doenças.
- Exame clínico do animal para avaliar sua condição atual, devendo ser observado com atenção:
  - ✓ os sintomas fisiológicos, tais como batimentos cardíacos, freqüência respiratória, temperatura corporal, tonicidade muscular;
  - ✓ os sintomas bioquímicos, tais como níveis de ACTH e endorfinas;
  - ✓ os padrões de alimentação, por exemplo, quantidade ingerida.
- Estado mental: observe se o animal está apático, deprimido, agressivo ou hiperexcitado, principalmente se tais traços são variáveis de seu comportamento habitual. O técnico encarregado do cuidado do animal é, em geral, a melhor pessoa para observar essas alterações no comportamento.
- A atividade do animal pode variar desde a inatividade total até a hiperatividade. Observe se há alterações no andar, na postura ou expressão facial.
- A vocalização vai depender da espécie, e há uma grande variedade de sons produzidos por cada uma. O som produzido pode estar fora do alcance da audição humana (ultra ou infra-som) e, portanto, passar despercebido, ao mesmo tempo que causa desconforto a outros animais da mesma espécie.
- Resposta aos analgésicos: se for administrada uma droga analgésica, e a condição e o comportamento do animal melhorarem, este pode, então, ser um diagnóstico útil para constatar que havia dor.

Essa é somente uma descrição geral de como avaliar a dor qualitativamente; é necessário considerar como quantificá-la para poder julgar se é necessário aliviá-la, ou se o grau de dor está dentro dos limites aceitáveis.

Wolfenhson & Lloyd (1994) propõem que sejam observados vários sintomas clínicos para a avaliação da dor, o que ajudaria a indicar se o animal está ou não sofrendo. Esses sintomas são:

- aparência;
- consumo de água e alimento;
- sintomas clínicos;
- comportamento normal;
- comportamento provocado.

São atribuídas notas de 0 a 4, dependendo da intensidade dos sintomas, e a soma total dos pontos de cada sintoma indica a intensidade da dor do animal. O uso desse sistema permite que o animal seja observado mais de perto, e isto faz com que sejam melhores os padrões de cuidado com os animais. Lembre-se que, no caso de dúvida, em relação a se acabar ou não o experimento, o bem-estar do animal deve vir sempre em primeiro lugar.

É condição indispensável que as pessoas envolvidas com o experimento a ser realizado, ou com a criação dos animais, conheçam bem o comportamento normal da espécie com a qual estão trabalhando, para que possam avaliar a dor quando esta afetar os animais.

Soma (1987) relaciona uma série de sintomas clínicos e comportamentais que os animais podem apresentar em caso de dor. Quando a dor for 'aguda' podemos ter:

- POSTURA DE GUARDA – tentativa de se proteger, fugir ou morder;
- GRITOS – movimentos;
- MUTILAÇÃO – lamber, morder, coçar, tremer;
- INQUIETAÇÃO – caminhar, deitar e levantar, peso de um lado só;
- SUDORESE – no cavalo;
- DEITADO – período de tempo não-usual;
- CAMINHAR – relutância em se mover, dificuldade para levantar;
- POSIÇÕES ANORMAIS – cabeça para baixo, abdômen contraído.

A dor 'crônica' é a mais difícil de ser avaliada, e os seguintes comportamentos devem ser observados:

- redução da atividade;
- perda do apetite;
- alterações da personalidade;
- esconder-se em um canto;
- recusa em se movimentar;
- alterações na urina;
- alterações na consistência das fezes;
- falta de higiene pessoal;
- automutilação.

No caso de dor crônica, pode haver um ciclo de dor ⇒ lesão ⇒ dor difícil de controlar.

Há uma grande variação nas respostas comportamentais entre espécies e entre indivíduos da mesma espécie. Os animais endogâmicos (*inbred*) possuem menor variabilidade individual.

SINTOMAS DE DOR ESPECÍFICOS DAS ESPÉCIES

- CAMUNDONGO – varia entre as diferentes linhagens
  - ✓ aumento do tempo de sono;
  - ✓ perda de peso/desidratação;
  - ✓ piloereção e postura encurvada;
  - ✓ isolados do resto do grupo;
  - ✓ gritam ao serem tocados.

- Rato
  - ✓ vocalização;
  - ✓ perda de peso;
  - ✓ piloereção/postura encurvada;
  - ✓ hipotermia;
  - ✓ descarga ocular (cromodacriorréia);
  - ✓ ato de lamber-se;
  - ✓ maior agressividade.
- Cobaia
  - ✓ vocalização;
  - ✓ não resistem quando segurados;
  - ✓ não respondem aos estímulos;
  - ✓ em geral, sonolentos e sem agressividade.
- Coelho
  - ✓ diminuição do consumo de água e alimento;
  - ✓ olham para a parte de trás da gaiola;
  - ✓ movimentos limitados;
  - ✓ fotossensibilidade;
  - ✓ acima de tudo, estóicos.
- *Hamster*
  - ✓ perda de peso;
  - ✓ período maior de sono;
  - ✓ aumento da agressividade ou depressão;
  - ✓ diarréia.
- Gato
  - ✓ perda do apetite;
  - ✓ falta de higiene pessoal;
  - ✓ aparência de demência;
  - ✓ ronronar;
  - ✓ vocalização variável.
- Cão
  - ✓ mais quietos e menos alertas;
  - ✓ inapetência, tremores e respiração difícil;
  - ✓ morder o local afetado.
- Ruminantes
  - ✓ deprimidos, inapetência;
  - ✓ ranger de dentes;
  - ✓ redução na ruminação e eructação.
- Porcos
  - ✓ comportamento anti-social;
  - ✓ vocalização.

- Répteis
  - ✓ contração dos músculos;
  - ✓ perda de peso, anorexia.

- Primatas não-humanos
  - ✓ pouca reação à dor;
  - ✓ aparência miserável, postura encolhida;
  - ✓ expressão triste/evitam a companhia;
  - ✓ falta de higiene pessoal;
  - ✓ inapetência.

- Peixes
  - ✓ movimentos musculares fortes;
  - ✓ comportamento natatório anormal.

Considerando o que foi dito anteriormente sobre dor em animais de laboratório, há necessidade de evitá-la e de controlá-la. A dor é, em geral, desnecessária na maioria dos procedimentos científicos. O uso de analgésicos durante ou após intervenções dolorosas deve fazer parte integrante dos protocolos de experimentação. Em caso de intervenções cirúrgicas, a dor deverá ser avaliada para saber da necessidade ou não de se administrar analgésicos. A questão não é só a de se administrar um analgésico, é preciso reavaliar o quadro para saber se a dor foi controlada. Em certos casos, pode ser que um tipo de analgésico seja contra-indicado, porém é difícil não haver nenhum outro viável para o caso específico.

É de grande importância lembrar e salientar que a dor produz alterações fisiológicas que não só dificultam a recuperação do animal como podem também afetar seu experimento e bem-estar.

Os analgésicos utilizados são de duas categorias: opióides e esteróides não-esteroidais (Nsaids).

Quando na avaliação a dor for considerada de moderada a severa, os opióides são as drogas de eleição para produzir o alívio da dor. O período de duração de seu efeito é, em geral, de quatro horas e há uma grande variedade de opióides disponíveis. Estes provocam efeitos hipnóticos e analgésicos e também depressão significativa nos sistemas respiratório e cardiovascular, bem como alterações no sistema termorregulador. Entretanto, os efeitos colaterais não devem ser usados como desculpa para não aliviar a dor, pois estes têm sido evitados utilizando-se uma dosagem menor (Green, 1982).

Os opióides mais utilizados em medicina veterinária incluem, mas não se limitam, a (o):

- morfina – droga mais usada. Possui até quatro horas de duração de alívio da dor. Em cães, causa problemas gastrointestinais. Ao contrário do que se acredita, pode ser usada com segurança em gatos;
- meperidine – efeito semelhante ao da morfina. É usado em cães por não apresentar complicações gastrointestinais. Útil em cavalos;
- fentanil – combinado com droperidol produz analgesia profunda. Tem curta duração e apresenta menos efeitos colaterais;
- oximorfone – mais potente que a morfina, estabilidade cardiovascular maior que os outros opióides. Muito usado combinado com diazepam ou acepromazina em animais velhos e doentes;
- etorfina – mais usado em flechas para imobilizar animais selvagens e de zoológico. É extremamente potente. Também usado com sucesso em alguns animais de sangue frio. Esse opióide é perigoso para humanos. Reversor: diprenorfina (M5050);
- carfentanil – preferido pelos veterinários de zoológicos por sua alta potência. Pode ser administrado por meio de *spray* na mucosa nasal ou bucal. Reversor: ciprenorfina (M 285) ou diprenorfina. Fatal para o homem se injetado acidentalmente.

A maior preocupação com os analgésicos citados antes são os efeitos colaterais:

- VÔMITOS – só ocorre nas espécies que vomitam – não é o caso dos suínos, ovinos, roedores e coelhos;
- DEPRESSÃO RESPIRATÓRIA – não tão significativa em animais quanto no homem;
- HIPOTENSÃO.

Outra contra-indicação é o uso de opióides em traumatismo craniano. Os opióides aumentam a pressão intracraniana e o fluxo sangüíneo cerebral em virtude do aumento da tensão de CO_2 como conseqüência de seu efeito depressivo na ventilação. A procura por analgésicos com menos efeitos colaterais do que os agonistas *m* puros levou ao desenvolvimento de agonistas *m* parciais e agonistas kappa, como:

- BUTORFANOL – analgésico sintético com potência cinco vezes maior que a da morfina. O grau de sedação ocorre e a depressão respiratória atinge um efeito máximo que não aumenta com o aumento das doses. A analgesia dura de 2 a 5 horas;
- BUPRENORFINA – é o analgésico de escolha para os animais de laboratório. Ação: de 8 a 12 horas. Antagoniza os efeitos depressores dos agonistas opióides.

Antagonistas Opióides

- HIDROCLORETO DE NALOXONE – reverte os efeitos dos opióides (isto inclui a analgesia). Não produz depressão respiratória ou cardiovascular;
- NALONORFINE e DIPRENORFINE.

Antiinflamatórios Não-Esteroidais (Nsaids)

Os antiinflamatórios não-esteroidais são usados no controle da dor de intensidade leve a moderada e são muito úteis quando o uso de opióides não é possível. Eles não possuem senão pequena ação analgésica central. A ação dessas drogas reduz a inflamação e, assim, a sensibilidade periférica.

Efeitos Colaterais Alteram Função Renal e Ulceração Gástrica

Os gatos metabolizam esses agentes lentamente e, portanto, não devem ser tratados com freqüência.

Ação de Alguns Analgésicos:

- ASPIRINA – ineficaz para dores viscerais;
- NAPROXEN – usada quando a aspirina não faz efeito;
- FLUNIXIN – maior efeito analgésico, usado para dores osteoartríticas. Causa grandes problemas gastrointestinais no cão;
- DIPIRONA – analgésico, antipirético, antiinflamatório. Pode acarretar discrasia sangüínea;
- KETOPROFEN e CARPROFEN – 30 vezes mais potente que a aspirina. Não produzem ulceração gastrointestinal e são de longa duração (até 24 horas).

Considerações Adicionais Sobre o Manejo da Dor

É importante reconhecer que a dor tem um componente emocional e que sua intensidade está associada à presença de outras emoções como, por exemplo, o medo.

O uso de analgésicos não deverá se limitar somente quando de intervenções cirúrgicas ou traumatismos, mas também deverá ser incluído no plano de cuidados com o animal para prover o seu bem-estar.

Referências Bibliográficas

FLECKNELL, P. A. Refinement of animal use – assessment and alleviation of pain and distress. *Laboratory Animals*, 28(3):222-231, 1994.

GREEN, C. J. *Laboratory Animal Handbook: animal euthanasia.* UK: Ed. Laboratory Animals Ltd., 1982.

LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATION (LASA). Working Party-The assessment and control of the severity of scientific procedures on Laboratory Animals. *Laboratory Animals*, 24:97-130, 1990.

MONTGOMERY JR., C. Control of animal pain and distress in cancer and toxicological research. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 191(10):1277-1281, 1987.

SOMA, L. R. Assessment of animal pain in experimental animals. *Laboratory Animals Science*, 37:71-74, 1987.

WOLFENHSON, S. & LLOYD, M. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. Oxford: Oxford University Press, 1994.

Bibliografia

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (CCAC). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

Procedures of Colloquium on *Recognition and Alleviation of Animal Pain and Distress*. *American Veterinarian Medical Association*, 191(10):1184-1298, 1987.

ROYAL SOCIETY FOR THE PREVENTION OF CRUELTY TO ANIMALS (RSPCA). *Pain and Suffering in Experimental Animals in the United Kingdom*. London: Ed. RSPCA, 1983.

nestesia em Animais de Experimentação

Ekaterina Akimovna B. Rivera

Introdução

A principal razão para o uso de anestésicos é a de prover a contenção humanitária do animal, visando, também, a atingir um grau razoável de relaxamento muscular para facilitar a cirurgia e, principalmente, produzir analgesia suficiente a fim de que o animal não sofra.

O sucesso da anestesia não depende somente do tipo de droga, das doses ou das vias de administração utilizadas. Para que a anestesia se realize de maneira satisfatória, é necessário ter um bom nível de zelo com o animal, tanto no pré quanto no pós-operatório, cuidando, inclusive, da redução do estresse e do controle da dor.

Os efeitos de um anestésico devem ser consistentes e passíveis de serem repetidos. Além disso, o anestésico deve oferecer grande margem de segurança tanto para o animal quanto para o operador.

Uma anestesia bem conduzida é de fundamental importância para a validade científica de qualquer estudo que utilize animais. No caso de um estudo em que o animal tenha de se recuperar da anestesia, este deve retornar a sua normalidade fisiológica tão rapidamente quanto possível. Não poderemos ter, por exemplo, um animal sofrendo de dor, medo, inapetência, desconforto, hipotermia, hipóxia ou acidose respiratória, pois todos estes itens são indicativos de uma anestesia mal conduzida.

A anestesia deve interferir o menos possível com o experimento que está sendo realizado, e não deve alterar os dados que estiverem sendo registrados. Porém, caso haja qualquer alteração, esta deve ser avaliada.

Os equipamentos empregados para a anestesia deverão ser sempre os mais adequados para a espécie animal a ser tratada.

Cuidados Pré-Operatórios

Os animais deverão ser submetidos a exame clínico meticuloso antes de serem anestesiados. Um animal saudável e livre de infecções (clínicas ou subclínicas), sobretudo aquelas do trato respiratório, terá menos problemas durante a anestesia.

É importante lembrar da sensibilidade individual do animal e de que alguns reagem melhor do que outros à anestesia.

Não é necessário o jejum prévio em coelhos e roedores antes da anestesia, pois esses animais não vomitam; além disso, os roedores se tornam hipoglicêmicos muito rapidamente quando em jejum. É necessário o jejum quando da cirurgia gastrointestinal superior, mas o estômago só ficará completamente vazio se conseguirmos evitar a coprofagia.

É importante o manuseio cuidadoso do animal, e deve ser feito por pessoa treinada para que o mesmo não sinta medo ou estresse ao ser levado de sua sala para o local de cirurgia.

Medicação Pré-Anestésica

As finalidades da pré-medicação são:

- reduzir o medo e a apreensão e, com isto, obter uma indução livre de estresse;
- reduzir as quantidades de outros anestésicos necessários para induzir a anestesia geral, diminuindo, assim, os efeitos colaterais indesejáveis;
- facilitar a recuperação da anestesia;
- reduzir a salivação e as secreções brônquicas e bloquear o reflexo vaso vagal, onde ocorre a bradicardia devido à intubação endotraqueal e ao manejo das vísceras;
- reduzir a dor pós-operatória.

As drogas utilizadas na pré-anestesia são as anticolinérgicas, os tranqüilizantes e os sedativos.

Os anticolinérgicos bloqueiam o estímulo parassimpático e diminuem a salivação e as secreções brônquicas; também protegem o coração da inibição vagal que ocorre quando as vísceras são manuseadas. A droga de escolha é o sulfato de atropina na concentração de 600 mg por ml.

Os tranqüilizantes e sedativos produzem efeito calmante sem causar sedação, e não possuem ação analgésica. Há grande variação entre as espécies quanto ao efeito dessas drogas. Dentre as mais usadas, temos:

- FENOTIAZINAS, por exemplo, acepromazina e cloropromazina – podem causar hipotensão e queda da temperatura corporal;
- BUTIROFENONAS, por exemplo, fluanisona – mais potentes que as fenotiazinas e menos hipotensoras;
- BENZODIAZEPINAS, por exemplo, diazepam, midazolam – excelente sedação, bom relaxamento muscular e potentes anticonvulsivantes;
- METEDOMIDINA – droga relativamente nova. Sua maior vantagem é ser rapidamente reversível, fazendo com que o animal retorne à normalidade muito mais rapidamente.

Anestesia Geral

A anestesia é uma combinação de narcose, relaxamento e analgesia; sua escolha depende de vários fatores. Qualquer que seja a droga utilizada, esta afetará a fisiologia do animal de alguma maneira. Em uma anestesia bem balanceada, as drogas são administradas em combinação, incluindo a pré-medicação, os anestésicos e os analgésicos, para poder se chegar a uma melhor estabilidade fisiológica do animal e, assim, reduzir os efeitos colaterais indesejáveis.

Diferentes drogas induzem a diferentes estágios em diferentes graus.

Deve-se tirar vantagem da grande variedade de drogas anestésicas e das combinações disponíveis, e não se limitar a um ou outro método que pode não ser o melhor para todos os tipos de protocolo experimental, já que diferentes procedimentos exigem diferentes tipos de profundidade e de duração de anestesia. A anestesia deverá ser escolhida somente quando todos os fatores que potencialmente podem influenciar o protocolo forem considerados.

Em geral, o primeiro passo a ser dado por um anestesiologista é saber se o anestésico a ser utilizado deverá ser inalável ou injetável. Há a possibilidade de se usar os dois métodos: os agentes injetados são usados para a indução e os inalados para a manutenção da anestesia.

Quando os agentes são inalados, a anestesia é maior. Os agentes inalados são eliminados, principalmente, pelos pulmões, ao passo que os injetados precisam ser metabolizados pelo fígado e excretados pelos rins. Esse processo é mais demorado, portanto, é mais lenta a volta à fisiologia normal, ao controle da hipotermia e ao equilíbrio eletrolítico. Porém, as novas drogas injetáveis têm agentes reversores específicos que apressam a recuperação.

É melhor se ter uma recuperação rápida e prover analgesia pós-operatória adequada do que se ter uma anestesia prolongada.

Outros fatores que influem na escolha do anestésico incluem a espécie utilizada, a duração do procedimento, a profundidade da anestesia exigida e a natureza do procedimento.

Anestésicos Inalatórios

A técnica mais utilizada para anestesiar um pequeno roedor é a de colocá-lo em um recipiente contendo algodão embebido no anestésico. Nada menos indicado. Além do contato direto com o anestésico ser altamente irritante para as mucosas do animal, a concentração da droga não pode ser medida. Esse modo de conduzir uma anestesia é perigoso para o anestesiologista e para as outras pessoas, pois há probabilidade não só de que estes inalem grandes quantidades da droga, mas também de perigos de explosão e de fogo, principalmente com o éter.

Os agentes voláteis devem ser administrados para os animais por meio de um aparelho para anestesia, usando oxigênio e óxido de nitrogênio como transportadores.

O laboratório deverá dispor de máquina para anestesia com os seguintes componentes básicos: cilindros de gás, válvula de redução, medidor de fluxo, vaporizador. Essas máquinas podem ser feitas no próprio laboratório, caso as comerciais sejam muito caras.

OBS.: a concentração do agente volátil não depende do peso do animal, mas do próprio agente. Assim, animais maiores não necessitam de concentrações maiores de anestésico.

Há vários agentes voláteis disponíveis. Dentre esses, os mais comuns são:

- METOXIFLURANO – produz indução e recuperação lentas. Isso significa grande segurança com boa atividade analgésica, que se prolonga pelo período pós-operatório;
- HALOTANO – largamente empregado. É um líquido não-inflamável, muito potente, com alto índice terapêutico, sendo, portanto, muito seguro. Não irritante para as membranas, é o mais barato. Podem ser notados tremores durante a recuperação. Isso se deve a seu efeito depressor cardíaco, que reduz a pressão sangüínea, sensibilizando o coração para os efeitos arrítmicos das catecolaminas;
- ISOFLURANO – mais seguro que o halotano, com pouco efeito nas enzimas hepáticas, porém, bem mais caro.

Outros agentes semelhantes ao isoflurano são o enflurano, desflurano e sevoflurano.

Qualquer que seja o agente escolhido, este deverá ser usado juntamente com o óxido nitroso.

Como o óxido nitroso possui efeitos cardiovasculares e respiratórios mínimos, é usado com o agente volátil para reduzir as concentrações dos agentes, diminuindo assim seus efeitos colaterais. É comum utilizá-lo nas concentrações de 60:40 ou de 50:50 com o oxigênio para liberar o agente volátil. Após uma anestesia prolongada, deverá ser dado oxigênio puro por 5 a 10 minutos, caso contrário o oxigênio poderá ser deslocado dos pulmões pelo óxido, causando hipóxia, abrindo a possibilidade de desencadear um colapso respiratório.

Devemos mencionar o éter, que foi muito utilizado, mas que possui muitos problemas associados ao seu uso: muito irritante para as membranas mucosas, pode exacerbar doenças respiratórias preexistentes, causar períodos de excitação involuntária antes da anestesia, aumentar os níveis de catecolaminas, causando hiperglicemia, e afetar as enzimas hepáticas; é extremamente explosivo, o que faz com que seja proibido por medidas de segurança.

AGENTES INJETÁVEIS

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os agentes injetáveis são administrados ou por via endovenosa ou outra via parenteral. Em animais de experimentação, o tamanho ou a difícil contenção de alguns faz com que as vias mais utilizadas sejam a intramuscular e a intraperitoneal. Essas vias exigem doses mais altas da droga. É necessário pesar o animal, pois a estimativa de peso é em geral pouco precisa. Também é importante que as drogas usadas em animais de experimentação tenham ampla margem de segurança, não sejam irritantes e possam ser administradas em pequeno volume por meio de seringa com agulha fina (25-27). Em virtude da grande variação na resposta às drogas entre as espécies, linhagens, sexos e indivíduos, é melhor usar uma droga, ou combinação de drogas, que forneça ampla margem de segurança.

A maioria dos agentes injetáveis produz pobre analgesia e são insuficientes para cirurgias maiores. A absorção pelas vias intraperitoneal, subcutânea e intramuscular pode ser lenta. Também a recuperação é lenta e, portanto, os efeitos residuais da droga podem persistir por longos períodos. Há também um lapso de tempo entre a injeção da droga e a profundidade da anestesia. É necessário, portanto, uma boa avaliação da profundidade desta.

Para facilitar a aplicação da injeção em animais mais nervosos, pode ser usado um creme anestésico local (Eutectic Mixture of Local Anesthetics – EMLA – ou ASTRA), que deve ser aplicado 30-60 minutos antes para dessensibilizar a pele.

Dentre os anestésicos injetáveis, os barbitúricos foram largamente usados, e dentre estes citamos o pentobarbital, tiopental, methohexitono, thiamylal e inactin.

Os barbitúricos produzem depressão do Sistema Nervoso Central (SNC) e depressão cardiovascular e respiratória acentuadas. O efeito analgésico é fraco, exigindo grandes doses. Em geral, a dose letal é ligeiramente maior do que a dose clínica. A recuperação também é lenta e pode estar associada a movimentos convulsivos. São mais usados em concentrações altas para eutanásia.

Agentes não barbitúricos foram desenvolvidos como o propofol, que é administrado endovenosamente, age rapidamente, induzindo à anestesia suavemente, sem efeitos colaterais e com recuperação rápida; pode ser usado em infusão continuada para cirurgias de longa duração. Pode, ainda, ser empregado com segurança em ratos, gatos, cães, primatas, porcos e coelhos e há possibilidade de ser combinado com uma grande variedade de pré-medicamentos, analgésicos e agentes inaláveis.

Outro agente injetável dessa mesma classe que é bastante popular é o saffan, uma mistura de alfaxalona, esteróides e alfadolona. É usado em quase todas as espécies animais, menos no cão, porque há um componente nessa mistura que causa liberação de histamina e conseqüente anafilaxia. É o anestésico de eleição para primatas.

Dentre os agentes dissociativos, citamos a ketamina, que pode ser administrada em injeção intramuscular ou endovenosa. Em geral, é usada em combinação com outros agentes, como a xilazina ou o diazepam, para evitar os efeitos colaterais como tremores musculares.

Os analgésicos narcóticos são muito potentes, mas podem provocar depressão respiratória. O fentanil tem efeito sedativo em ratos, cães e primatas, mas em camundongos, gatos e cavalos causa excitação.

Os analgésicos neurolépticos são combinados com um neuroléptico (tranqüilizante) ou com um analgésico narcótico. Se utilizados sozinhos, produzem depressão respiratória e pouco relaxamento muscular. Porém, se combinados com os benzodiazepínicos, esses efeitos colaterais diminuem sensivelmente. Uma excelente opção de anestesia para roedores e coelhos é a combinação de fentanil/fluanisona com midazolam ou diazepam. Os efeitos dos neurolépticos podem ser revertidos por meio de antagonistas como naloxona ou agonistas parciais, como buprenorfina.

Anestesia Não Reversível

Os animais que serão submetidos a procedimentos terminais deverão ter os mesmos cuidados que os animais que recebem anestesia para procedimentos cirúrgicos com recuperação. Muitas vezes, os procedimentos terminais são mais invasivos e o animal necessita de maiores cuidados. Alguns anestésicos, como o pentobarbital e o hidrato de cloral, somente deveriam ser usados para procedimentos terminais.

Anestesia de Longa Duração

Quando for necessária uma anestesia prolongada, temos quatro opções:

- dose única, com um anestésico de longa duração, como alfa-clorosa;
- injeções intermitentes – é essencial um bom monitoramento;
- infusão continuada, via endovenosa, como o fentanil/midazolam;
- agentes inalatórios com indução anterior.

Técnicas Combinadas

A finalidade do equilíbrio anestésico é o de minimizar a interferência causada pelas drogas com a fisiologia animal e de prover uma recuperação suave, rápida e livre de dor. Isso é possível combinando vários anestésicos como, por exemplo, administrando sedativos antes da indução com um agente inalável.

Anestesia Local

Esta é uma outra opção de anestesia, muito utilizada em animais de fazenda. Pode ser feita por meio de infiltração ao redor da área da cirurgia proposta ou por meio de bloqueio dos nervos específicos do campo cirúrgico. Se for feita injeção epidural ou subdural, a área de anestesia pode ser bastante extensa.

Qualquer que seja o método de anestesia escolhido, é essencial manter um alto padrão de cuidado com os animais, se quisermos obter dados de pesquisa significativos.

Manejo Anestésico

Quando administradas doses elevadas de anestesia, ocorre a morte do animal. Contudo, se as doses forem insuficientes, o animal sofrerá dor. Para evitar que esses dois extremos ocorram, deve-se monitorar as funções respiratória e circulatória, a temperatura corporal e a profundidade da anestesia.

Profundidade da Anestesia

O animal anestesiado não está simplesmente dormindo ou morto. Portanto, os animais devem ser monitorados freqüentemente, pelo menos a cada 5 minutos ou mais, até que seja atingida a profundidade certa da anestesia. Não se pode monitorar somente um sinal isoladamente do resto do animal. O reflexo podal

é o mais comumente usado, além do da cauda ou da orelha. Essas respostas podem ocorrer se tivermos atingido a anestesia, porém, não indicam a profundidade da mesma. Nesse estado, o animal poderá estar em perigo e morrer de colapso respiratório ou cardiovascular. O monitoramento dos sinais vitais indicará essas alterações logo de início, e ações preventivas poderão ser tomadas.

Respiração

Devem ser monitorados o padrão, a profundidade e o ritmo. O movimento do peito é um bom indicador. A cor das membranas mucosas mostra a efetividade das trocas de gases pulmonares. Virtualmente, todo anestésico causa alguma depressão respiratória, que leva à hipóxia e hipercapnia. É possível haver depressão do ritmo e isso não significa que o animal esteja profundamente anestesiado, mas sim prendendo a respiração. Deve-se verificar sempre se não há obstrução do esôfago devido ao acúmulo de secreções ou sangue.

Sintomas Cardiovasculares

O método mais simples de monitoramento é a qualidade e o ritmo do pulso. Um bom teste é apertar um pouco a membrana mucosa até que fique pálida e verificar o tempo necessário para voltar ao normal. Se o animal estiver bem, a volta da tonalidade natural da mucosa deve acontecer em 2 a 3 segundos. O colapso cardíaco pode ocorrer subitamente, mas em geral ele é gradual, devido à hipotensão. A perda de sangue e de líquidos pode causar choque hipovolêmico e parada cardíaca. Em pequenos roedores, a perda de sangue em geral leva à morte, já que representa alta proporção em relação à quantidade total de sangue do animal. Poderá ser feita transfusão sangüínea, pois reações à transfusão são raras na primeira vez, e nunca ocorrerão se os animais doadores e receptores forem da mesma linhagem endogâmica.

Temperatura Corporal

Toda anestesia afeta a termorregulação em pequenos animais. Com isso, a temperatura corporal sofre redução, a menos que sejam tomadas medidas preventivas. A queda é exacerbada pelo fluxo de ar frio da máquina de anestesia, pela depilação do animal, pelo uso de preparados frios na pele, pela mesa operatória fria, pela exposição das vísceras durante a cirurgia e pela administração de fluidos frios. Animais menores têm uma superfície maior em relação ao volume, e são, portanto, muito susceptíveis ao frio. Essa perda de calor pode ser minimizada por meio de insulação com algodão ou lã, cama aquecida como Vetbed, ou qualquer outro artefato para reter calor. Lâmpadas de calor ou cobertores aquecidos são boas fontes de calor, mas deve-se tomar cuidado para não queimar o animal. É importante garantir a manutenção das medidas para prevenir a hipotermia durante todo o período de recuperação. Podem ser usadas incubadoras e uma boa cama também ajuda; por exemplo, uma feita de papel toalha, Vetbed etc. Não deve ser usada serragem de madeira, pois esta pode aderir ao nariz e à boca dos animais ou às feridas.

A hipotermia é a causa mais comum de mortalidade em pequenos roedores, por isso, monitorar a temperatura corporal e tomar as medidas necessárias para prevenir a hipotermia são de vital importância.

Os reflexos oculares são maus indicadores da profundidade da anestesia. Muitas vezes, dependendo da espécie, o reflexo palpebral é inexistente – em roedores, é difícil avaliar, e, em coelhos, ele pode existir até quando a anestesia já está demasiadamente profunda.

Emergências na Anestesia

Medidas a serem tomadas em caso de colapso cardiorrespiratório:

- passagens aéreas – limpá-las e mantê-las livres;
- respiração – ventilar com oxigênio 20 vezes por minuto. Se necessário, usar doxapram;
- circulação – massagem cardíaca.

Em seguida:

- administre fluidos para recuperar a circulação (líquidos mornos);
- restaure o ritmo cardíaco:
  - ✓ para assístole, administre adrenalina, solução de 1 ml/kg de 1:10000 endovenosa iv;
  - ✓ repita aos 10 minutos se necessário;
  - ✓ para fibrilação, administre lignocaina, 1-2 mg/kg, injeção intracardíaca.
- quando o animal estiver estabilizado, continue a ventilação e mantenha a circulação (fluidos e adrenalina).

Cuidado com a Hipotermia

Trate a acidose ou o edema cerebral, se necessário. Para a acidose, bicarbonato a 1.5 ml/kg de solução a 5 por cento, lentamente, por via endovenosa.

Para reduzir o edema, utilize corticosteróides ou diuréticos.

Cuidados Pós-Operatórios

Todos os parâmetros monitorados durante a cirurgia devem continuar a ser monitorados no período pós-operatório. O ideal é ter uma área específica para a recuperação, onde possa ser feito acompanhamento individual. Na área de recuperação, drogas e equipamentos de emergência devem estar disponíveis.

Verificar periodicamente:

- calor e conforto;
- depressão respiratória;
- equilíbrio de fluidos;
- perda sangüínea – cuidado com perdas internas, podem passar despercebidas;
- perda plasmática – principalmente quando de cirurgias abdominais;
- diminuição dos fluidos extracelulares por evaporação;
- urina – redução do volume da urina pode ser causado por desidratação, lesão do trato urinário, ou dor;
- fezes – se o animal não defecar, pode ser devido à ausência de fezes, ou paralisia do íleo (hidrato de cloral no rato);
- peso corporal – excelente indicador da recuperação da cirurgia, bem como o consumo de água e alimento.

A atenção individual que deve ser dispensada a cada animal depende da espécie. Animais de estimação reagem bem ao contato pessoal, ao passo que ratos e coelhos podem ficar estressados com o contato.

A área de recuperação deve levar em consideração a espécie animal. Luz, temperatura, ruído devem ser adequados. Gaiolas e camas devem prover conforto e manter o animal limpo e seco. Quando o procedimento exigir a imobilização do animal, ele deverá ser mudado de posição periodicamente para evitar a formação de úlceras de decúbito.

Todos os dados deverão ser registrados, bem como as drogas que serão administradas. Esses registros devem estar disponíveis e são de grande importância.

Bibliografia

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

Cunliffe-Beamer, T. L. *Guidelines for the well-being of rodents in research:surgical techniques.* Madison, USA: Ed. Guttman, 1990.

Flecknell, P. *Laboratory Animal Anesthesia*: *an introduction for research workers and technicians*. New York: Academic Press, 1987.

Green, C. J. *Laboratory Animal Handbook 8: animal anesthesia*. London: Laboratory Animals Ltd., 1982.

Institute for Laboratory Animal Resources (Ilar). Comission on Life Sciences, National Research Council. *Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academic Press, 1992.

Tuffery, A. *Laboratory Animals*: *an introduction for new experimenters.* Chichester: J. Wiley & Sons Ltd., 1987.

Waynforth, H. B. *Experimental and Surgical Technique in the Rat.* London: Academic Press, 1980.

Wolfehnson, S. & Lloyd, M. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*: *surgical procedures*. Oxford: Oxford University Press, 1994.

Estresse em Animais de Laboratório

Ekaterina Akimovna B. Rivera

Introdução

Existem várias definições de estresse: Selye (1976); Ewbank (1973) Fraser, Ritchie & Fraser (1975); Moberg (1985); Broom (1988); Manser (1992). Porém, todos concordam em que 'o estresse ocorre quando condições adversas produzem respostas fisiológicas no indivíduo'. Essa resposta é uma tentativa do animal de manter a sua homeostase, ou seja, o equilíbrio fisiológico normal do corpo. Algumas definições incluem certos padrões comportamentais que podem ajudar a restaurar a homeostase e, assim, facilitar as adaptações fisiológicas ao estresse.

Deve-se sempre lembrar que estresse é um estado, e que estressor é a causa.

Em animais de experimentação, o estresse é, primariamente, de natureza emocional ou psicológica. Muitas situações, que parecem comuns para o homem, são estressantes para animais de experimentação como, por exemplo, a exposição à luz muito clara ou a espaços muito amplos.

Várias condições podem causar estresse psicológico. Entre elas, cabe salientar:

- novidade;
- estímulos indutores de medo;
- fatores sociais;
- incapacidade de realizar padrões normais de comportamento;
- causas de dor, desconforto e doença;
- antecipação de dor e desconforto;
- manejos que levem à frustração ou ao conflito;
- procedimentos que causem doenças ou indisposição.

O estresse é inevitável. O conceito popular diz que o estresse é inerente e ruim e que deve ser evitado a todo custo. Entretanto, este é parte da vida, e os sistemas biológicos sofisticados sofreram evolução para ajudar a conviver com ele. O segredo para proteger o bem-estar animal está em minimizar os custos biológicos de um estresse indesejável (Moberg, 1985).

Em estresse, há dois termos muito importantes: controle e previsão. Dependendo do grau em que o estressor pode ser controlado ou previsto, teremos maior ou menor gravidade dos sintomas de estresse, portanto a gravidade não depende somente do estressor.

O estresse pode ser dividido em:

- AGUDO – é o estado em que um organismo se apresenta após uma diminuição súbita na previsão e/ou controle de alterações relevantes. Nesse caso, os conflitos são curtos e de intensidade exagerada.
- CRÔNICO – é o estado de um organismo quando alterações relevantes têm baixa previsão e/ou não são muito bem controladas por um longo período de tempo. Em geral, desenvolvem-se quando os conflitos não podem ser resolvidos e são de natureza mais constante.

Poder controlar ou não a situação de estresse depende dos mecanismos dos quais o animal dispõe para lidar com o desafio, e da atitude que cada indivíduo tem sobre a situação. Quando a situação for considerada de perigo para a homeostase, são ativados mecanismos para controlar ou conviver com a mesma. Os mecanismos de adaptação são vários e não só a reação a um estressor pode variar, como também o tipo de reação pode diferir entre indivíduos.

Há dois tipos de reação:

- ATIVA – caracterizada por tentar controlar ativamente a situação;
- PASSIVA – caracterizada por uma aceitação passiva da situação.

Em algumas ocasiões, podem se apresentar os dois tipos de reação.

Causas do Estresse

Não é possível listar todos os prováveis estressores, pois as causas que são estressantes para alguns indivíduos não são para outros. Com certeza a dor é um dos principais estressores. A função biológica primária da dor é a de sinalizar lesão potencial ou existente de tecidos. O animal, ao sentir dor, tenta eliminá-la por meio de posturas ou comportamentos diversos. Porém, quando, apesar de tudo, não consegue, pode apresentar respostas de má adaptação, e estará não só estressado, como também em 'distresse'. Além da dor, há uma gama enorme de fatores que demonstraram ser importantes no desencadeamento do estresse.

As causas do estresse não originadas da dor podem ser agrupadas em três categorias:

- métodos experimentais;
- causas ambientais ou ecológicas;
- causas internas ou fisiológicas.

Essas categorias são usadas para facilitar a sua interpretação e auxiliar na sua prevenção, porém uma não exclui a outra. Por exemplo, o estresse experimental pode se somar a um ambiente inadequado, causando alterações fisiológicas ao animal.

Os animais de experimentação não vivem em seu hábitat natural e devemos lembrar que, apesar de este ser determinado pelo homem, temos de considerar que tipo de ecologia esse hábitat provê. Deve ser dada atenção à natureza de relações que o animal estabelece com o seu meio ambiente. O animal e o ambiente são entidades organizadas, dinâmicas e devem ser vistas em virtude de suas necessidades e objetivos. Com isto, há uma série de interesses que se mesclam e que nem sempre são compatíveis, pois há choques entre os interesses dos animais e os interesses do homem. Por um lado, há uma combinação de preocupações econômicas e de propósitos da instituição (pesquisa, produção ou exibição), e por outro, o desejo de manter os animais em condições de boa saúde, sem estresse, provendo bem-estar aos mesmos.

Dentro dessa preocupação humanitária de prover bem-estar animal e de evitar o estresse, a ecologia do animal utilizado deve ser considerada.

Como avaliar o ambiente em que está alojado o animal sob a perspectiva ecológica do mesmo? O julgamento profissional, a empatia e a intuição são indispensáveis, mas há normas que nos dão informações objetivas e confiáveis a serem seguidas.

Em primeira instância, todos os animais possuem necessidades básicas quanto a nutrientes, água, temperatura ambiental, umidade, iluminação, barulho e ciclos de luz e escuro. A importância desses itens para o bem-estar animal é reconhecida e são consideradas como requerimentos para um bom manejo. Outras características ecológicas são também importantes no estresse. Com base em considerações ecológicas, podem ser mencionados seis tópicos considerados mais relevantes para o desencadeamento do estresse:

- Relações com os co-específicos
- Relações presa/predador
- Ninho
- Arquitetura espacial
- Alimentação
- Acontecimentos ambientais

Relações com os Co-Específicos

Espaço social: o espaço que o animal mantém, entre si mesmo e os outros animais, é o seu espaço pessoal, e ele não tolera intromissão nessa área, o que o leva à agressão contra o intruso. A área de espaço pessoal varia entre as espécies, e o animal é, em geral, mais tolerante com o sexo oposto. A tolerância parece ser menor entre animais do mesmo sexo, animais desconhecidos e animais em idade de reprodução;

Superpopulação: quando o número de animais excede o ponto crítico, a interação social é atingida, dando início a agressões e à diminuição da reprodução com causas fisiológicas;

Isolamento: nesse caso, os fatores mais importantes são os que estão relacionados com a idade em que o isolamento ocorre e com experiências sociais anteriores. É incontestável que os animais jovens necessitam do calor e do alimento providos pela mãe. Também necessitam de estímulo de outros animais adultos para que aprendam a desenvolver um comportamento social normal. O comportamento de animais, quando separados desde o seu nascimento, é atípico, porém não há trabalhos indicando que esses animais fiquem estressados cronicamente. Entretanto, eles desenvolvem comportamentos de má adaptação, como a automutilação, a timidez ou a agressividade excessiva, a inabilidade de se acasalar normalmente, dentre outros.
A separação de recém-nascidos de seus pais faz com que estes procurem substitutos para os mesmos. Se não conseguirem, surgem repostas que indicam estresse. Nos primatas, as mães demonstram reações emocionais quando separadas de seus filhotes.
Também há problemas quando da separação entre animais adultos, ainda que estes tenham sido menos estudados do que as relações filhos/pais.

Estimulação social positiva: o fato de brincar, fazer a higiene pessoal, ou simplesmente de ficar quieto, quando em contato com outros animais da mesma espécie, são atividades normais de animais sociáveis, e possuem efeitos imediatos no aparecimento de emoções. Por exemplo, o ato de limpar um ao outro, ou de se acariciar, pode reduzir rapidamente os sinais de estresse.

Apesar de se pressupor que privar os animais do contato com os outros ou de estímulos sociais seja uma grave fonte de estresse, isto não se aplica a todos os animais. O estresse será menos severo, ou mesmo ausente, se os animais forem pouco gregários, altamente agressivos, velhos ou acostumados a ter pouco contato com os demais.

Relação Presa/Predador

A predação não é um problema comum em animais de laboratório, porém podem surgir comportamentos de presa/predador nas relações do tratador/animal, e destes com membros de sua própria espécie.

Por isso, é de suma importância o modo como o tratador lida com os animais. Movimentos bruscos podem fazer com que o animal, antes dócil, se torne agressivo e ataque o tratador, alterando as relações entre ambos. Esse tipo de reação é defensiva e comum em animais em cativeiro, ocorrendo geralmente quando o animal está assustado ou com medo. Essa situação pode se tornar causa de estresse. Um caso comum de atitude defensiva é a da fêmea com filhotes pequenos.

Ninho

Para que algumas espécies desenvolvam suas funções biológicas satisfatoriamente, é essencial que haja disponibilidade de materiais para camas e ninhos. A presença ou a ausência dos mesmos pode desencadear o estresse, como, por exemplo, ratos que têm lugares onde se esconder são mais agressivos do que os criados em caixas abertas.

Arquitetura Espacial

O espaço em que os animais se encontram, a distribuição das atividades em uma área definida e os tipos de atividade variam com as diferentes espécies. É comum se pensar que as gaiolas onde se encontram os animais impedem os mesmos de exercer as atividades típicas da espécie, por isso, são estressantes e levam ao desenvolvimento de anomalias estereotipadas. Isso é possível, porém um problema que é bem mais complexo não pode ser abordado de modo tão simplista. Devemos prover um ambiente o mais semelhante possível àquele em que o animal encontra na natureza. Entretanto, em função da dificuldade de se propiciar ambiente semelhante, devemos considerar benefícios *versus* custos de construção, de instalação, de higiene, entre outros parâmetros, que podem tornar inviável o uso de tais instalações.

Alimentação

As dietas utilizadas para animais de experimentação são, sem dúvida alguma, bem balanceadas, porém não podem ser esquecidos os padrões de comportamento alimentar dos animais. O fato de não ter de procurar comida, as preferências e aversões, a freqüência e quantidade das dietas levam a uma monotonia na forma de se alimentar com rações que são oferecidas nas gaiolas. O rato norueguês, por exemplo, é onívoro, e em cativeiro só come ração peletizada. Alguns pontos devem ser considerados no quesito alimentação:

Adaptação: muitas espécies se adaptam com facilidade às alimentações oferecidas em cativeiro e, desde que adequadamente administradas, tanto qualitativa quanto quantitativamente, não deverão ser causa de estresse.

Resposta a novos alimentos: algumas espécies são muito sensíveis às mudanças na cor, textura, odor e aparência dos alimentos. Se forem administrados alimentos novos, estes deverão ser introduzidos gradativamente.

Necessidade de variação: a monotonia de comer o mesmo alimento pode levar à redução na ingestão deste e, conseqüentemente, ao estresse e à perda de peso. Para algumas espécies animais, a variação da dieta pode ser estimulante.

Transição do leite para o alimento sólido: o desmame e a transição para o alimento sólido pode ser muito estressante tanto para a mãe quanto para os filhotes. A transição deverá ser feita pouco a pouco, até que o animal seja capaz de se manter somente com alimentos sólidos.

Procura de alimentos: a procura por alimentos é parte integrante do comportamento animal e parece independer da necessidade imediata de comer. Porém, poucos estudos têm sido realizados para saber se a privação desse comportamento causa estresse.

Esquema de alimentação: os animais que estiverem acostumados a receber alimento em horários predeterminados, quando sofrem mudanças substanciais desses horários, ficam frustrados e aumentam sua atividade em típica resposta fisiológica de estresse.

Causas Ambientais

Na sua maioria, os animais em cativeiro estão em posição passiva com relação a acontecimentos ambientais. Os procedimentos de manejo podem ser estabelecidos de modo a minimizar o estresse dos animais, porém estes não têm ou têm pouca influência sobre como esses procedimentos serão executados. Isso contrasta enormemente com a situação na natureza, onde os animais têm a responsabilidade da manutenção de seu bem-estar.

Algumas situações que demonstraram ser estressantes para os animais de experimentação são, muitas vezes, práticas comuns de manejo. A troca de caixas, contenção física, injeções, modificações na rotina são acontecimentos que confrontam o animal com a novidade, a imprevisibilidade e a perda do controle, que são potencialmente estressantes.

O transporte é conhecido como causador de estresse em animais. Se esse estresse se deve a alterações no ritmo circadiano, troca de ambiente familiar, barulho e vibração, temperatura extrema, desidratação ou outro fator, a causa não é conhecida.

Além da dor e de doenças, há uma série de fatores que podem induzir os animais ao estresse. Foram listados apenas aqueles mais freqüentes, ressalvando que há necessidade de mais pesquisas na área.

Respostas ao Estresse

Manser (1992) sugere que é a resposta emocional ao estresse físico que leva a uma resposta fisiológica, mais do que o estressor físico por si só. Quanto menor for o controle sobre a situação que está causando o estresse, mais intensa será a resposta a este. Como já citado anteriormente, a mesma situação pode dar lugar a diferentes respostas, dependendo do acontecimento poder ou não ser previsto.

Principais fatores que influenciam a resposta ao estresse:

- meio ambiente;
- predisposição genética;
- sensibilidade individual.

Ao se tentar diagnosticar o estresse, é óbvio que deve-se primeiramente estudar um dos três meios que o animal possui para responder a uma situação estressante: comportamental, ativação do sistema nervoso autônomo e ativação do sistema neuroendócrino (Moberg, 1985).

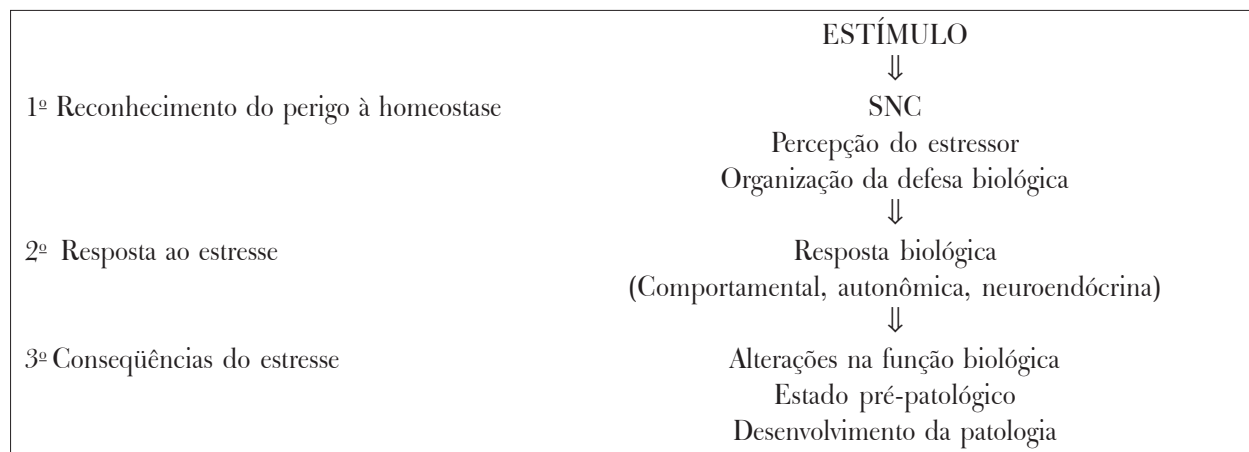
A resposta comportamental é a mais simples e, provavelmente, é a reação biológica mais econômica ao estresse. Um animal pode se livrar de uma situação estressante simplesmente trocando de lugar. Se não for suficiente, ele pode apresentar outros tipos de comportamento, desde a vocalização até a expressão de comportamentos estereotipados. Certamente que alterações comportamentais são sugestivas de que está ocorrendo estresse, mas isso não significa que esse estresse seja prejudicial, com exceção de casos extremos, como o de automutilação. Quando a resposta comportamental não alivia o estresse, o animal necessita, então, alterar seu estado biológico, evocando os dois sistemas que respondem ao estresse, sistema nervoso autônomo e sistema neuroendócrino.

O sistema nervoso autônomo possui respostas rápidas e específicas a muitos estressores, como aumento do batimento cardíaco, da respiração, e da secreção de catecolaminas. Muitos estressores alteram a secreção dos hormônios da pituitária, que regulam diretamente a reprodução, resistência a doenças, desenvolvimento normal e crescimento, todos indicadores de bem-estar.

De todas as partes do sistema neuroendócrino, o sistema corticoadrenal tem sido o favorito para monitorar o estresse, pois os glicocorticóides (cortisol e corticosterona) são secretados em resposta a uma grande variedade de estressores físicos e emocionais.

A resposta ao estresse deve ser considerada segundo as conseqüências do mesmo, isto é, o custo que compromete o bem-estar animal.

Quadro 1 – Modelo para a resposta biológica dos animais durante o estresse

	ESTÍMULO ⇓
1º Reconhecimento do perigo à homeostase	SNC Percepção do estressor Organização da defesa biológica ⇓
2º Resposta ao estresse	Resposta biológica (Comportamental, autonômica, neuroendócrina) ⇓
3º Conseqüências do estresse	Alterações na função biológica Estado pré-patológico Desenvolvimento da patologia

Fonte: Moberg (1985).

Não importa qual o tipo de resposta o animal utilize, sempre ocorre uma alteração na função biológica, o que impõe um custo, seja este eficiente ou não para ajudar o animal a lidar com o estressor. Um estressor não é um risco para o bem-estar só porque evoca um comportamento ou porque o sistema adrenocortical responde. É o terceiro componente que conta para efeitos adversos do estresse no animal, e é este o verdadeiro perigo para seu bem-estar. É a mudança na função biológica que ocorre durante o estresse que determina o custo biológico para o animal. Um estressor somente causa perigo ao bem-estar quando retira recursos biológicos do animal que o colocam em perigo de desenvolvimento de patologias.

A doença não é o único estado patológico viável. O animal estará em condições patológicas se perder sua habilidade de manter suas funções normais, por exemplo, a capacidade de reprodução.

Em resumo, podemos dizer que as respostas fisiológicas agudas possuem duas funções:

- estruturar o organismo de modo que este possa lidar de forma comportamental e fisiológica com o desafio;
- facilitar o aprendizado e a memória, o que permitirá ao animal reagir mais adequadamente a um estressor semelhante em uma próxima ocasião.

De fato, os mecanismos fisiológicos e neuroendócrinos podem ser considerados como mecanismos básicos de todos os tipos de comportamento. Portanto, só podem ser usados como parâmetros indicativos de distúrbios do bem-estar do organismo quando apresentarem desvios, a longo prazo, dos valores normais.

Medidas do Estresse

A medida a ser utilizada deve ser uma resposta biológica que tenha um impacto significativo no bem-estar animal. Antes que qualquer medida biológica (comportamental, autonômica ou neuroendócrina) possa ser usada para medir o estresse, deve ser estabelecido que a alteração causada pelo estresse naquela medida tenha correlação com alteração significativa no bem-estar animal (Moberg, 1985).

Apesar de que as alterações patológicas podem ser usadas como medida do estresse, esperar para que tais patologias se desenvolvam não representa uma abordagem humanitária para avaliar as condições potenciais do

estresse. O desenvolvimento de um estado pré-patológico pode ser o melhor indicador de estresse. Indica que o animal está começando a sofrer de estresse e que está agora em desconforto.

As técnicas necessárias para medir estados pré-patológicos existem. São elas: função imune, sistema reprodutor e alguns tipos de comportamento (Moberg, 1985).

Para medir o estresse, devem ser usados métodos que não causem distúrbios ao animal, sempre que possível, métodos não-invasivos. Mesmo não havendo manifestações clínicas de doença, este não é um indicador válido de saúde e bem-estar, quando a doença subclínica pode ser demonstrada no *post mortem*, quando há imunossupressão e quando há sinais de comportamento alterado, frustração e desconforto.

Ao se medir o estresse, é melhor usar sempre mais do que um tipo de medida:

• Alterações comportamentais
• Sintomas clínicos
• Parâmetros fisiológicos
• Indicadores bioquímicos
• Achados patológicos
• Indicadores imunológicos

Alterações Comportamentais

Para poder avaliar alterações de comportamento, é necessário conhecer bem o etograma, o tipo de comportamento normal da espécie com a qual você vai trabalhar, bem como o comportamento individual do animal. Por exemplo, ratos e camundongos gritam ao serem manuseados, e podem se tornar mais dóceis ou mais agressivos quando estiverem sentindo alguma dor. É um método não-invasivo de avaliar o estresse. Exige um mínimo de manuseio e de familiarização com a pessoa que vai tomar conta dos animais. Às vezes, é conveniente que mais de uma pessoa avalie as alterações.

Uma câmara de vídeo colocada acima da gaiola pode ser muito útil na avaliação do comportamento.

Alguns parâmetros comportamentais que podem ser medidos:

• higiene pessoal;
• apetite – consumo de água e de alimento;
• atividade;
• agressividade;
• expressão facial;
• vocalização;
• aparência;
• postura;
• resposta ao manejo.

Sinais Fisiológicos

• temperatura corporal – afetada pelo estresse, pode ser medida por radiotelemetria;
• pulso;
• respiração;
• perda de peso – bom indicador de estresse crônico;
• contagem de células sangüíneas – não é um bom indicador;
• estrutura de células sangüíneas;
• ritmo cardíaco/pressão arterial;
• fluxo sangüíneo.

A tabela de Morton & Griffiths (1985) lista alguns sintomas que podem ser medidos:

Cardiovascular

• ritmo cardíaco
• pulso
• diminuição da circulação periférica
• extremidades azuis e frias

Respiratório

• padrão de respiração anormal
• respiração ofegante
• secreção nasal

Digestivo

• fezes alteradas em volume, cor, consistência
• vômitos
• icterícia
• salivação

Nervoso ou musculoesquelético

• tremores, convulsões
• paralisia, pupila dilatada
• reflexos lentos ou ausentes etc.

Miscelânea

• edema, protusões
• alterações na urina
• olhos afundados etc.

As medidas de ritmo cardíaco e de pressão arterial são muito úteis. Estas podem ser persistentes e se apresentarem elevadas em situações cronicamente estressantes.

Telemetria – excelente método não-invasivo, porém caro. Cateteres intra-arteriais também são usados.

Indicadores Bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos mais utilizados para medir estresse são:

• corticosteróides – glucocorticóides;
• catecolaminas – adrenalina, noradrenalina;
• tiroxina;
• prolactna;
• endorfina – peptídeos opióides;
• hormônios da pituitária anterior;
• glucagon e glicose;

- insulina;
- vasopressina – hormônios da pituitária posterior;
- substância P;
- atividade da renina plasmática – indicador sensitivo do estresse repetitivo;
- enzimas plasmáticas;
- neuroquímica;
- sistema imunológico;
- enzimas hepáticas e musculares;
- peptídeo atrio-natriurético – necessita de mais estudos;
- fator de crescimento neural;
- lipídeos – não muito sensitivo;
- hormônio de crescimento.

Lesões Patológicas

São ótimos indicadores de estresse. Geralmente, essas alterações ocorrem como conseqüência de persistentes níveis elevados de hormônios de estresse, como catecolaminas e glicocorticosteróides. Muitas lesões estão associadas ao estresse e devem ser levadas em consideração ao se avaliar o mesmo.

É também um indicador de estresse não-invasivo.

Há outros parâmetros que também podem ser medidos no *post mortem*:

- peso das glândulas adrenais, timo e baço;
- amostras sangüíneas;
- urina;
- alterações neuroquímicas no cérebro;
- conteúdo de catecolamina e enzimas nas glândulas adrenais.

Alguns achados em virtude do estresse:

- ulceração gástrica;
- lesões cardiovasculares;
- lesões renais;
- amiloidose;
- hipertrofia e hemorragia das adrenais;
- alterações músculoesqueléticas;
- aceleração das alterações retina por causa da idade;
- alterações de peso de alguns órgãos.

Sinais Clínicos

É um método não-invasivo de medir o estresse, mas necessita de pessoa capacitada para fazê-lo, geralmente um médico veterinário.

Beynen et al. (1987) mediram os seguintes sinais em vários trabalhos sobre estresse:

- atividade exploratória;
- postura corporal;
- aparência do pêlo;
- aparência dos olhos;

- secreção de olhos e nariz;
- higiene do orifício anal;
- aparência da cauda;
- aparência das orelhas e patas;
- resposta à palpação do hipocôndrio direito (pedras na vesícula biliar).

Avaliação do Estresse

Ao usarmos os diferentes tipos de medida de estresse, há vários pontos a serem considerados e que, se negligenciados, podem anular os resultados.

Citaremos, apenas para exemplificar, um dos parâmetros que podem ser medidos: os glicocorticóides.

Nas avaliações bioquímicas, os glicocorticóides são muito utilizados, porém somente para estresse agudo; no caso de estresse crônico, a avaliação não é válida porque os níveis de glucocorticóides decrescem rapidamente após elevação inicial. Também os glicocorticóides não indicam a gravidade do estresse, nem se este é de adaptação ou não. Ele é afetado pela variação diurna, diferença de sexos, de linhagem e de espécies, e depende de experiências anteriores. É medido por meio dos testes: Ria para o plasma, e Elisa para a saliva e a urina.

Os níveis de glicocorticóides se elevam com o simples manejo. Essa possível elevação é evitada com o manejo adequado.

Há inúmeros parâmetros que podem ser medidos, como catecolaminas, hormônios, contagem de células sangüíneas etc., e não nos é possível descrevê-los todos aqui. Mas, em todos os casos, há que se ter cuidado ao coletar dados imediatamente após a ação do estressor, pois serão diferentes daqueles que se apresentarem minutos após – se bem que alguns sintomas de estresse podem levar anos para se desenvolverem.

Também, dependendo da natureza do estressor, serão ativados diferentes ativadores de estresse, principalmente porque a resposta se adapta à função desejada. Por exemplo: às vezes é mais sensato secretar hormônios catabólicos (glicocortocóides) do que aumentar a atividade.

Não é nada simples avaliar estresse, e há dois problemas básicos:

- as medidas obtidas são difíceis de interpretar;
- a repetição do estudo leva a diferentes resultados.

Ainda há muito por fazer para que possam ser utilizados animais em experimentação sem causar estresse aos mesmos, não só para que não haja variáveis nos resultados de nossos estudos, mas principalmente para que possamos prover bem-estar e consideração aos animais que utilizamos.

Referências Bibliográficas

Beynen, A. C. et al. Assessment of discomfort in gallstone-bearing mice: a parctical example of the problems encounterd in an attempt to recognise discomfort in laboratory animals. *Laboratory Animals*, 21:35-42, 1987.

Broom, D. Needs, freedoms and the assessment of welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 19:384-386, 1988.

Fraser, D.; Ritchie, J. S. D. & Fraser, A. F. Stress in a veterinary context. *British Veterinary Journal*, 131:635-662, 1975.

Manser, C. *The Assessment of Stress in Laboratory Animals*. Hertfordshire: Ed. RSPCA, 1992.

MOBERG, G. P. *Animal Stress*: *biological response to stress: key to assessment of animal well being*. USA: Ed. G. Moberg, 1985.

MORTON, D. B. & GRIFFITHS, P. H. M. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Veterinary Record*, 116:431-436, 1985.

SELYE, H. *The Stress of Life*. UK: McGraw-Hill Book Co., 1976.

BIBLIOGRAFIA

DE BOER, S. F.; VAN DER GUGTEN, J. & SLANGEN, J. L. Plasma catecholamines and corticosterone responses to predictable and unpredictable stress in rats. *Physiology and Behaviour*, 45:789-795, 1989.

EWBANK, R. Use and abuse of the term "*stress*" in husbandry and welfare. *Veterinary Record*, 92:709-710, 1973.

WOLFENSOHN, S. & LLOYD, M. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. Oxford: Oxford University Press, 1994.

Eutanásia

Celia Virginia Pereira Cardoso

Introdução

Por definição, eutanásia significa morte sem dor ou sofrimento (do grego *euthanasia* – a morte bela ou feliz). Diversas técnicas são preconizadas com tal objetivo. Elas devem preencher, sempre que possível, os seguintes requisitos:

- serem humanitárias, não causando terror ou sofrimento ao animal;
- não impressionar ou sensibilizar as pessoas que assistem ao ato;
- ter um tempo mínimo para a perda da consciência;
- não produzir alterações que prejudiquem a interpretação das lesões;
- ser um método de fácil aplicação, ação rápida e baixo custo;
- não ocorrer de o sangue se espalhar pelo local, evitando-se, dessa forma, contaminações que possam propiciar disseminação de doenças infecto-contagiosas;
- não oferecer perigo ao profissional que o execute.

Seja qual for o método eleito para se praticar a eutanásia, ele deve sempre ser executado por profissional habilitado ou por técnicos treinados e sob supervisão.

O local onde se realizará a eutanásia deve ser afastado e separado de salas ou alojamentos de outros animais.

Outro procedimento importante é a avaliação da dor e do estresse a que o animal está submetido. Para isso, é indispensável que o profissional responsável pela eutanásia conheça o comportamento do animal e suas respostas fisiológicas.

Sintomas de ansiedade e medo no animal consciente podem ser expressos da seguinte forma: vocalização angustiada; agitação; ações defensivas; tentativas de fuga; tremores musculares; dilatação da pupila; salivação intensa; micção e defecação involuntárias; sudorese e aumento das freqüências respiratória e cardíaca. Porém, nos processos de eutanásia, esses sintomas poderão estar associados àqueles produzidos pela indução de anestésicos, quando são observados o delírio, a excitação ou a inibição de atividades. Assim, é necessário medirmos o grau de inconsciência do animal por meio da ausência dos reflexos palpebrais ou por meio do eletroencefalograma.

Considerando a condição dos biotérios, onde se busca uma maior produtividade com menor custo possível, o descarte de animais indesejáveis ao plantel é necessário. A eutanásia é empregada nos animais doentes, fora do padrão genético e/ou sanitário, mutilados devido a brigas, com defeitos físicos, em fase final da vida reprodutiva, idosos ou, ainda, quando proliferam em excesso.

Métodos para Eutanásia

Físicos

Utilizados quando outros métodos podem invalidar uma determinada informação ou pesquisa, principalmente aquelas relacionadas com a bioquímica do animal.

Para animais de laboratório convencionais, os métodos físicos mais indicados são:

Deslocamento cervical – praticados em camundongos, ratos e outras espécies pequenas. É um procedimento rápido que consiste no rompimento da medula espinhal do animal e conseqüente perda total de sensibilidade e morte. A técnica se resume em segurar a cauda do animal com uma das mãos e com a outra apoiar uma pinça de dissecção, ou objeto similar, transversalmente sobre sua região cervical (pescoço). A seguir, pressiona-se firmemente a pinça para baixo e para frente, empurrando a cabeça do animal, enquanto, simultaneamente, traciona-se a cauda em sentido oposto para trás. Um espaçamento de 2 mm a 4 mm entre o côndilo occipital e a primeira vértebra cervical torna-se palpável após o descolamento. Ainda podemos observar alguma atividade muscular, por alguns segundos, mas trata-se apenas de movimentos reflexos, pois a perda total de sensação dolorosa e a morte são imediatas.

Traumatismo craniano – praticado principalmente em coelhos, cobaias e ratos. É uma prática esteticamente desagradável e deve ser evitada diante de observadores casuais. Consiste em aplicar um golpe na base do crânio com força suficiente para produzir depressão do sistema nervoso central. Esse procedimento deve ser realizado por profissionais capacitados, de modo a propiciar a imediata e total perda da consciência e a insensibilidade à dor. Subseqüentemente, os principais vasos sangüíneos devem ser seccionados, o tórax aberto e o músculo cardíaco incisado. Quando utilizarmos esse método em coelhos, o golpe deve ser aplicado com o auxílio de um bastão de madeira e o animal deve estar suspenso pelos membros posteriores e com o corpo distendido.

Decapitação – praticado em camundongos, ratos e outras espécies pequenas. É também uma prática esteticamente desagradável, mas tem efeito similar a uma injeção intravenosa de barbitúrico. Pode ser realizada com o auxílio de tesoura ou de equipamento mais apropriado, a guilhotina. Provoca a morte instantânea com imediata perda de reflexos e nivelamento da eletroencefalografia. Vale salientar que o sangue coletado após a decapitação apresenta-se freqüentemente contaminado por secreções salivares e respiratórias.

Exanguinação – praticado em todos os roedores e nos coelhos. Freqüentemente utilizado para obtenção de soro hiperimune. Os animais devem ser previamente sedados ou anestesiados, pois pode se observar inquietação associada à hipovolemia. Caso não seja possível esse procedimento prévio, devido à interferência indesejáveis das drogas, a eutanásia deve ser realizada por profissionais bem treinados. A técnica consiste em realizar uma punção cardíaca ou de vasos sangüíneos de grande calibre até se obter a sangria total.

Para animais não-convencionais de laboratório, vale ressaltar que é recomendado a administração de tranqüilizantes em espécies como: cães, gatos, primatas não-humanos e outras, de médio e grande porte, antes da aplicação de qualquer método de eutanásia. Para esses tipos de animais, os métodos físicos mais indicados são:

Tiro por arma de fogo – o método exige, por motivos óbvios, cuidados por parte do profissional responsável. É indicado apenas para grandes animais. O tiro deve ser dado com armas de calibre 20 ou 22 e desfechado na região frontal, linha compreendida entre os olhos e a base das orelhas, circunstância em que o projétil atinge diretamente o encéfalo e provoca imediata insensibilidade e morte do animal. A colocação de vendas em cavalos proporciona melhor imobilidade da cabeça do animal.

Eletrocussão – é uma prática de pouca aplicabilidade por exigir o emprego de equipamento especial. Deve ser acentuado, no entanto, que a corrente comum de 110 volts se presta bem para a eutanásia. Geralmente, esse método é utilizado para sacrifício de peixes e répteis, não sendo recomendado para gatos. O processo ocorre em duas fases: a administração do primeiro choque, que passa através do cérebro e produz a depressão do sistema nervoso central, e o segundo choque, que provoca a fibrilação do coração e o conseqüente bloqueio do suprimento de sangue (O_2) para o cérebro.

Químicos

São os métodos de melhor resolução e mais estéticos, não causando traumas aparentes ao animal.

Podem ser utilizados através de agentes farmacológicos inalantes e não-inalantes. Dentre eles, os mais recomendados estão descritos a seguir.

Agentes Farmacológicos Inalantes

Anestésicos inalantes – incluem o éter, o clorofórmio, o halotano e o metoxiflurano. O éter provoca irritação de mucosas das vias respiratórias, induz à salivação excessiva e aumenta a secreção brônquica. Ele determina parada respiratória e o animal deve ser mantido sob o efeito anestésico por mais alguns minutos para confirmação de sua morte. Por ser altamente inflamável, a utilização do éter requer cuidados especiais quando do destino da carcaça animal, pois ele continua se volatilizando, podendo causar algum acidente. O clorofórmio não deve mais ser utilizado, já que estão comprovados os seus efeitos tóxicos sobre o fígado, rins e gônadas masculinas dos animais, e ainda pelo fato de ser carcinogênico para o homem. O halotano e o metoxiflurano são muito caros e exigem equipamento apropriado na sua aplicação para evitar desperdício e contaminação do ambiente, além da necessidade de um tempo mais prolongado para realização da eutanásia.

Gases não-anestésicos – incluem o monóxido e o dióxido de carbono, o nitrogênio e o cianeto. Dos quatro gases o dióxido de carbono é o mais utilizado e o cianeto é extremamente tóxico e fatal, não sendo recomendado o seu uso em laboratórios. O CO_2 não é inflamável nem explosivo e por isso se torna mais seguro, desde que aplicado com equipamento apropriado; é de baixo custo e deve ser utilizado preferencialmente com a adição de 30% de oxigênio (O_2) para reduzir a ansiedade decorrente do desconforto da hipoxia, durante a fase de indução da eutanásia nos animais. A utilização de uma câmara hermeticamente fechada, com a entrada do gás localizada na parte superior, facilita o sacrifício, principalmente porque o CO_2 é uma vez e meia mais pesado do que o ar e se concentra na parte inferior do ambiente. A ação do CO_2 é rápida e tem ação letal por provocar depressão no sistema nervoso central. Como no uso do éter, o animal deve ser mantido por mais alguns minutos na câmara para confirmação de sua morte.

Agentes Farmacológicos Não-Inalantes

Pentobarbital sódico e derivados – são os mais utilizados e constituem o melhor método de eutanásia. A via de administração de eleição é a endovenosa porque proporciona a morte do animal mais rapidamente. Caso outras vias sejam utilizadas, verifica-se um retardo de tempo do efeito anestésico da droga e, conseqüentemente, do tempo para realização da eutanásia. Recomenda-se o dobro ou o triplo da dose anestésica para se obter êxito total na prática. Depois do sacrifício, que dura em média 15 minutos, deve-se realizar um exame cuidadoso do animal para constatar a sua total parada respiratória e morte.

Hidrato de cloral e cetamina – ambos são anestésicos dissociativos e, por isso, quando administrados, e já no estado de anestesia, são mantidos os reflexos oculares. A cetamina tem ainda excelente resultado quando combinada com outras drogas, tais como a xilazina e os benzodiazepínicos. Como no uso dos barbitúricos, após a sua aplicação em *overdose*, deve-se constatar a morte do animal.

Quadro 1 – Eutanásia: métodos físicos

Animal	Deslocamento Cervical	Traumatismo Craniano	Decapitação	Tiro de arma de fogo	Eletrocussão	Exanguinação
Camundongo	A	NR	A	NR	NR	A
Rato	A	A	A	NR	NR	A
Hamster	A	NR	A	NR	NR	A
Cobaia	A	A	NR	NR	NR	A
Coelho	NR	A	A	NR	NR	A
Gerbil	A	NR	A	NR	NR	NR
Gato	NR	NR	NR	NR	NR	A
Cão	NR	NR	NR	A	A	A
Ovino	NR	A	NR	A	A	A
Caprino	NR	A	NR	A	A	A
Suíno	NR	NR	NR	A	A	A
Macaco	A*	NR	A*	NR	NR	A
Pombo	A	NR	A	NR	NR	NR
Aves Domésticas	A	NR	A	NR	A	A

A – aceitável NR – não recomendado
* Espécies de macaco de pequeno porte. Ex.: *calithrix*, *saimiri*.

Quadro 2 – Eutanásia: métodos químicos – gases inalantes*

Animal	Monóxido de Carbono	Dióxido de Carbono
Camundongo	A	A
Rato	A	A
Hamster	A	A
Cobaia	A	A
Coelho	A	A
Gerbil	A	A
Gato	A	A
Cão	A	NR
Ovino	NR	NR
Caprino	NR	NR
Suíno	NR	A
Macaco	A	NR
Pombo	NR	A
Aves domésticas	NR	A

A – aceitável NR – não recomendado
* Empregado com o auxílio de uma câmara hermeticamente fechada para que o operador não corra perigo.

Quadro 3 – Eutanásia: métodos químicos – agentes farmacológicos não-inalantes

Animal	Barbitúricos (OV)	Via	Hidrato de Cloral (OV)	Via	Cetamina (OV)	Via
Camundongo	A	IP	NR		A	IM
Rato	A	IP	NR		A	IM
Hamster	A	IP	NR		A	IM
Cobaia	A	IP	NR		A	IM
Coelho	A	EV				
IP	A	EV	A	IM		
Gerbil	A	IP	NR		A	IM
Gato	A	EV				
IP	A	EV	A	IM		
Cão	A	EV				
IP	A	EV	A	IM		
Ovino	A	EV	A	EV	A	IM
Caprino	A	EV	A	EV	A	IM
Suíno	A	EV	A	EV	A	IM
Macaco	A	EV				
IP	A	EV	A	IM		
Pombo	A	IP	A	IP	A	IM
Aves domésticas	A	IP	A	IP	A	IM

A – aceitável NR – não recomendado
OV – overdose IP – intraperitonial
EV – endovenosa IM – intramuscular

Bibliografia

Animal Welfare Institute. *Basic Care of Experimental Animals*. New York: Academic Press, 1968.

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Canadian Council on Animal Care: Ottawa, 1984.

De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). *Animales de Laboratorio*: *guia para instalaciones y cuidado de animales de laboratório*. Washington, D.C.: OPS, 1965.

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Departamento de Biotérios/Bio-Manguinhos. *Manual para Técnicos em Animais de Laboratório.* Rio de Janeiro: Setor de Multimeios/Fiocruz, 1994.

Santos, J. A. & Mello, M. R. *Diagnóstico Médico Veterinário*: *colheita de material.* São Paulo: Nobel, 1976.

Descarte de Carcaças

Celia Virginia Pereira Cardoso

Introdução

Em biossegurança, o descarte de carcaças é um ato que requer grande senso de responsabilidade por parte do profissional que o está executando. Isso porque toda e qualquer carcaça, esteja ela contaminada por agentes patogênicos ou não, é considerada resíduo sólido, classificado como Grupo A, de acordo com a legislação em vigor em nosso país, expressa através da Resolução nº 5, de agosto de 1993, do Conselho Nacional do Meio Ambiente, que se encontra em anexo no final deste capítulo (Anexo 1).

Resíduos sólidos do Grupo A (Anexo 2) são, por definição, aqueles que apresentam risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente devido à presença de 'agentes biológicos'.

Mais especificamente, as carcaças de animais, mortos por morte natural ou sacrificados, devem ser destruídas o mais rápido possível, após a devida necropsia e colheita de material indicada, evitando-se assim o risco de contaminação do ambiente, por meio dos fluidos e das secreções excretados pelos cadáveres, que se transformam em excelentes meios de cultura.

O armazenamento de carcaças requer cuidados especiais. É essencial o uso de sacos plásticos, com capacidade e resistência compatíveis com o peso das carcaças, devidamente identificados de acordo com a simbologia adotada internacionalmente (Anexo 3).

Depois de acondicionadas em sacos plásticos, as carcaças devem ser mantidas em câmaras frias, por no máximo 24 horas, ou em freezers a -18 ºC, caso não sejam levadas ao seu destino final.

A proteção pessoal do profissional que manuseia carcaças de animais é fundamental. Uniformes adequados, com luvas e máscara, são recomendáveis. A consciência de que existe risco potencial de contaminação deve estar sempre presente na conduta dos técnicos.

O transporte das carcaças deve ser em sacos plásticos ou caixas hermeticamente fechadas, de forma rápida e segura, evitando-se a contaminação do ambiente através de possíveis vazamentos de sangue ou outros excrementos do cadáver do animal.

Quanto ao destino das carcaças, este pode ser de três formas: aterro sanitário, autoclavação e incineração.

Aterro Sanitário

Antes de se optar pelo uso de um aterro sanitário na cidade onde está localizado o biotério ou o laboratório de onde provirão as carcaças de animais, devemos nos certificar de que o aterro sanitário foi construído dentro de normas preestabelecidas que garantam a qualidade do meio ambiente, não danificando o solo ou poluindo o ar. Dessa forma, não se correrá o risco de disseminar doenças e, sim, evitá-las.

Caso haja possibilidade de construção de um aterro sanitário no próprio local de origem das carcaças, alguns cuidados deverão ser tomados.

A área aberta não deve ser de grande circulação de pessoal nem próxima de outros laboratórios. O buraco cavado na terra deverá ter no mínimo 50 cm de profundidade. Deve-se pôr uma camada de cal, com 2 cm de espessura, no fundo do buraco. Depois, coloca-se o cadáver e se faz uma nova cobertura com a cal. A quantidade de cal utilizada não deverá ser menos de 1 kg para cada 10 kg de matéria a destruir. Por último, fecha-se o buraco com terra.

Autoclavação

Neste caso, a carcaça é esterilizada e deixa de ser um risco de contaminação e pode-se descartá-la em um lixo comum.

Quando a carcaça está, sabidamente, contaminada por agentes patogênicos, a autoclavação é obrigatória antes do seu transporte do laboratório para o local de descarte.

Esse procedimento pode ser dispensado apenas quando existe um incinerador no próprio laboratório.

Dois problemas sérios são enfrentados na prática da autoclavação de carcaças. O primeiro está relacionado com a capacidade limitada das autoclaves, que, geralmente, não suportam um volume muito grande de animais mortos, principalmente quando se trata de espécies de porte médio ou grande. Nesse caso, uma saída pode ser a autoclavação por etapas, dividindo-se a carcaça em partes, autoclavando primeiro as mais implicadas na contaminação e mantendo-se as demais em *freezer* até a última autoclavação.

Outro problema é o forte odor produzido durante o processo. Sugere-se, então, que seja eleito um dia e um horário na semana para se autoclavar as carcaças, de preferência, próximo ao horário de saída do pessoal e/ou na véspera de folgas ou fins de semana. Se necessário, as carcaças podem ser acumuladas no *freezer* durante a semana para serem autoclavadas de uma só vez.

Incineração

Este é o melhor destino para as carcaças. É eficiente, seguro e, dependendo do seu modelo, pode servir ainda de fonte de calor para alimentar caldeiras.

O local de instalação deve ser de fácil acesso e próximo aos laboratórios que farão uso dele. Requer estudos prévios sobre sua capacidade, índice de poluição, tipo de combustível e métodos de seleção do material a ser incinerado. Vale ressaltar que, por razões óbvias, vidrarias, produtos químicos e inflamáveis não podem ser incinerados.

O sistema mais moderno de incineração conta com uma dupla câmara e recuperação de calor. Está provido, também, de filtros de manga em sua chaminé, que filtra toda a fumaça, evitando a poluição do ar e diminuindo, consideravelmente, o odor. Durante o processo, atinge a calcinação (cinzas) de qualquer matéria orgânica, destruindo todos os agentes patogênicos possíveis, chegando a atingir temperaturas de até 1.200 °C.

Bibliografia

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). *Resíduos Sólidos*; *Nbr 10004*. Rio de Janeiro: ABNT, 1987.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama). Resolução nº 5. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, *Diário Oficial da União*, 1993.

Monreal, J. & Zepeda, F. *Consideraciones sobre el Manejo de Residuos de Hospitales en America Latina*. Washington, D.C.: Opas, 1991.

World Health Organization (WHO). *Urban Solid Waste Management*. Copenhagen: WHO, 1991-1993.

ANEXO I

Ministério do Meio Ambiente
Conselho Nacional do Meio Ambiente
Resolução Nº 5, de 5 de agosto de 1993

O CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA, no uso das atribuições previstas na Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, alterada pelas Leis nº 7.804, de 18 de julho de 1989, e nº 8.028, de 12 de abril de 1990, e regulamentada pelo decreto nº 99.274, de 6 de junho de 1990, e no regimento Interno aprovado pela resolução/CONAMA/nº 025, de 3 de dezembro de 1986,

Considerando a determinação contida no art. 3º da Resolução/CONAMA nº 006, de 19 de setembro de 1991, relativa à definição de normas mínimas para tratamento de resíduos sólidos oriundos de serviços de saúde, portos e aeroportos, bem como a necessidade de estender tais exigências aos terminais ferroviários e rodoviários;

Considerando a necessidade de definir procedimentos mínimos para o gerenciamento desses resíduos, com vistas a preservar a saúde pública e a qualidade do meio ambiente; e,

Considerando, finalmente, que as ações preventivas são menos onerosas e minimizam os danos à saúde pública e ao meio ambiente, resolve:

Art. 1º Para os efeitos desta Resolução definem-se:

I - Resíduos Sólidos: conforme a NBR nº 10.004, da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT – "Resíduos nos estados sólido e semi-sólido, que resultam de atividades da comunidade de origem: industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes de sistemas de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos d'água, ou exijam para isso soluções técnica e economicamente inviáveis, em face à melhor tecnologia disponível.

II - Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos: documento integrante do processo de licenciamento ambiental, que aponta e descreve as ações relativas ao manejo de resíduos sólidos, no âmbito dos estabelecimentos mencionados no art. 2º desta Resolução, contemplando os aspectos referentes à geração, segregação, acondicionamento, coleta, armazenamento, transporte, tratamento e disposição final, bem como a proteção à saúde pública;

III - Sistema de Tratamento de Resíduos Sólidos: conjunto de unidades, processos e procedimentos que alteram as características físicas, químicas ou biológicas dos resíduos e conduzem à minimização do risco à saúde pública e à qualidade do meio ambiente;

IV - Sistema de Disposição Final de Resíduos Sólidos: conjunto de unidades, processos e procedimentos que visam ao lançamento de resíduos no solo, garantindo-se a proteção da saúde pública e a qualidade do meio ambiente.

Art. 2º Esta Resolução aplica-se aos resíduos sólidos gerados nos portos, aeroportos, terminais ferroviários e rodoviários e estabelecimentos prestadores de serviços de saúde.

Art. 3º Para efeitos desta Resolução, os resíduos sólidos gerados nos estabelecimentos, a que se refere o art. 2º, são classificados de acordo com o Anexo I desta Resolução.

Art. 4º Caberá aos estabelecimentos já referidos o gerenciamento de seus resíduos sólidos, desde a geração até a disposição final, de forma a tender aos requisitos ambientais e de saúde pública.

Art. 5º A administração dos estabelecimentos citados no art. 2º, em operação ou a serem implantados, deverá apresentar o Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos, a ser submetido à aprovação pelos órgãos de meio ambiente e de saúde, dentro de suas respectivas esferas de competência, de acordo com a legislação vigente.

§ 1º Na elaboração do Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos, devem ser considerados princípios que conduzam à reciclagem, bem como a soluções integradas ou consorciadas, para os sistemas de tratamento e disposição final, de acordo com as diretrizes estabelecidas pelos órgãos de meio ambiente e de saúde competentes.

§ 2º Os órgãos de meio ambiente e de saúde definirão, em conjunto, critérios para determinar quais os estabelecimentos estão obrigados a apresentar o plano requerido neste artigo.

§ 3º Os órgãos integrantes do Sistema Nacional do Meio Ambiente – SISNAMA –, definirão e estabelecerão, em suas respectivas esferas de competência, os meios e os procedimentos operacionais a serem utilizados para o adequado gerenciamento dos resíduos a que se refere esta Resolução.

Art. 6º Os estabelecimentos listados no art. 2º terão um responsável técnico, devidamente registrado em conselho profissional, para o correto gerenciamento dos resíduos sólidos gerados em decorrência de suas atividades.

Art. 7º Os resíduos sólidos serão acondicionados adequadamente, atendendo às normas aplicáveis da ABNT e demais disposições legais vigentes.

§ 1º Os resíduos sólidos pertencentes ao grupo “A” do Anexo I desta Resolução, serão acondicionados em sacos plásticos com a simbologia de substância infectante.

§ 2º Havendo, dentre os resíduos mencionados no parágrafo anterior, outros perfurantes ou cortantes estes serão acondicionados previamente em recipiente rígido, estanque, vedado e identificado pela simbologia de substância infectante.

Art. 8º O transporte dos resíduos sólidos, objeto desta Resolução, será feito em veículos apropriados, compatíveis com as características dos resíduos, atendendo às condicionantes de proteção ao meio ambiente e à saúde pública.

Art. 9º A implantação de sistemas de tratamento e disposição final de resíduos sólidos fica condicionada ao licenciamento, pelo órgão ambiental competente em conformidade com as normas em vigor.

Art. 10. Os resíduos sólidos pertencentes ao grupo “A” não poderão ser dispostos no meio ambiente sem tratamento prévio que assegure:

a) a eliminação das características de periculosidade do resíduo;

b) a preservação dos recursos naturais; e,

c) o atendimento aos padrões de qualidade ambiental e de saúde pública.

Parágrafo único. Aterros sanitários implantados e operados conforme normas técnicas vigentes deverão ter previstos em seus licenciamentos ambientais sistemas específicos que possibilitem a disposição de resíduos sólidos pertencentes ao grupo “A”.

Art. 11. Dentre as alternativas passíveis de serem utilizadas no tratamento dos resíduos sólidos, pertencentes ao grupo “A”, ressalvadas as condições particulares de emprego e operação de cada tecnologia, bem como considerando-se o atual estágio de desenvolvimento tecnológico, recomenda-se a esterilização a vapor ou incineração.

§ 1º Outros processos de tratamento poderão ser adotados, desde que obedecido o disposto no art. 10 desta Resolução e com prévia aprovação pelo órgão de meio ambiente e de saúde competentes.

§ 2º Após tratamento, os resíduos sólidos pertencentes ao grupo “A” serão considerados “resíduos comuns” (grupo “D”), para fins de disposição final.

§ 3º Os resíduos sólidos pertencentes ao grupo “A” não poderão ser reciclados.

Art. 12. Os resíduos sólidos pertencentes ao grupo “B” deverão ser submetidos a tratamento e disposição final específicos, de acordo com as características de toxicidade, inflamabilidade, corrosividade e reatividade, segundo exigências do órgão ambiental competente.

Art. 13. Os resíduos sólidos classificados e enquadrados como rejeitos radioativos pertencentes ao grupo “C”, do Anexo I, desta Resolução, obedecerão às exigências definidas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEM.

Art. 14. Os resíduos sólidos pertencentes ao grupo "D" serão coletados pelo órgão municipal de limpeza urbana e receberão tratamento e disposição final semelhante aos determinados para os resíduos domiciliares, desde que resguardadas as condições de proteção ao meio ambiente e à saúde pública.

Art. 15. Quando não assegurada a devida segregação dos resíduos sólidos, estes considerados, na sua totalidade, como pertencentes ao grupo "A", salvo os resíduos sólidos pertencentes aos grupos "B" e "C" que, por suas peculiaridades, deverão ser sempre separados dos resíduos com outras qualificações.

Art. 16. Os resíduos comuns (grupo "D") gerados nos estabelecimentos explicitados no art. 2º, provenientes de áreas endêmicas definidas pelas autoridades de saúde pública competentes, serão considerados, com vistas ao manejo e tratamento, como pertencentes ao grupo "A".

Art. 17. O tratamento e a disposição final dos resíduos gerados serão controlados e fiscalizados pelos órgãos de meio ambiente, de saúde pública e de vigilância sanitária competentes, de acordo com a legislação vigente.

Art. 18. Os restos alimentares "IN NATURA" não poderão ser encaminhados para a alimentação de animais, se provenientes dos estabelecimentos elencados no art. 2º, ou das áreas endêmicas a que se refere o art. 16 desta Resolução.

Art. 19. Os padrões de emissão atmosférica de processos de tratamento dos resíduos sólidos, objeto desta Resolução, serão definidos no âmbito do PRONAR – Programa Nacional de Controle e qualidade do Ar –, no prazo de 180 (cento e oitenta) dias, a contar da data de publicação desta Resolução, mantendo-se aqueles já estabelecidos e em vigência.

Art. 20. As cargas em perdimento consideradas como resíduos, para fins de tratamento e disposição final, presentes nos terminais públicos e privados, obedecerão ao disposto na Resolução do CONAMA nº 002, de 22 de agosto de 1991.

Art. 21. Aos órgãos de controle ambiental e de saúde competentes, mormente os partícipes do SISNAMA – Sistema Nacional do Meio Ambiente –, incumbe a aplicação desta Resolução, cabendo-lhes a fiscalização, bem como a imposição das penalidades previstas na legislação pertinente, inclusive a medida de interdição de atividades.

Art. 22. Os órgãos estaduais do meio ambiente com a participação das Secretarias Estaduais de Saúde e demais instituições interessadas, inclusive organizações não-governamentais, coordenarão programas, objetivando a aplicação desta Resolução e garantir o seu integral cumprimento.

Art. 23. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 24. Revogam-se as disposições em contrário, especialmente os itens I, V, VI, VII e VIII, da Portaria/MINTER/nº 053, de 01 de março de 1979.

Humberto Cavalcante Lacerda
Secretário-Executivo em exercício

Fernando Coutinho Jorge
Presidente

ANEXO II

CLASSIFICAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS

GRUPO A: resíduos que apresentam risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente devido à presença de agentes biológicos.

Enquadram-se neste grupo, dentre outros: sangue e hemoderivados; animais usados em experimentação, bem como os materiais que tenham entrado em contato com os mesmos; excreções, secreções e líquidos orgânicos; meios de cultura; tecidos, órgãos, fetos e peças anatômicas; filtros de gases aspirados de área contaminada; resíduos advindos de área de isolamento; restos alimentares de unidade de isolamento; resíduos de laboratórios de análises clínicas; resíduos de unidades de atendimento ambulatorial; resíduos de sanitários de unidade de internação e de enfermaria e animais mortos a bordo dos meios de transporte, objeto desta Resolução.

Neste grupo incluem-se, dentre outros, os objetos perfurantes ou cortantes, capazes de causar punctura ou corte, tais como lâminas de barbear, bisturi, agulhas, escalpes, vidros quebrados etc., provenientes de estabelecimentos prestadores de serviços de saúde.

GRUPO B: resíduos que apresentam risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente devido as suas características químicas.

Enquadram-se neste grupo, dentre outros:

a) drogas quimioterápicas e produtos por elas contaminados;

b) resíduos farmacêuticos (medicamentos vencidos, contaminados, interditados ou não utilizados); e,

c) demais produtos considerados perigosos, conforme classificação da NBR 10001 da ABNT (tóxicos, corrosivos, inflamáveis e reativos).

GRUPO C: rejeitos radioativos: enquadram-se neste grupo os materiais radioativos ou contaminados com radionuclídeos, provenientes de laboratórios de análises clínicas, serviços de medicina nuclear e radioterapia, segundo Resolução CENEN 6.05.

GRUPO D: resíduos comuns são todos os demais que não se enquadram nos grupos descritos anteriormente.

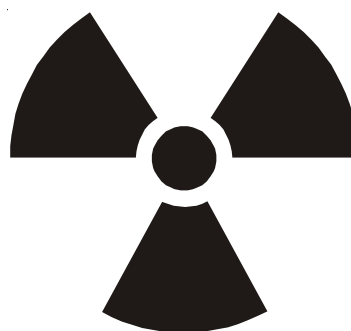
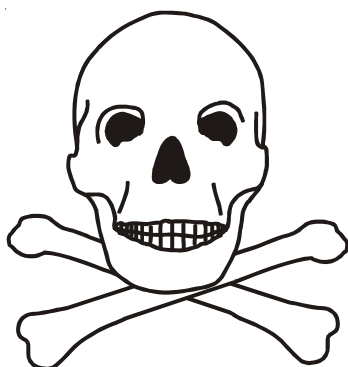
(Of. Nº 338/93)

Nº 166	Terça-feira, 31 AGO 1993	DIÁRIO OFICIAL	SEÇÃO I

12994 12997 12998

Anexo III

Símbolos Internacionais de Materiais Perigosos para Embalagens de Resíduos de Serviço de Saúde

Símbolo Indicativo de Material Infeccioso (Risco Biológico)

Símbolo Indicativo de Material Radioativo

Símbolo Indicativo de Substância Tóxica

Símbolo Indicativo de Materiais ou Substâncias Inflamáveis

Símbolo Indicativo de Substância Corrosiva

Símbolo Indicativo de Material Explosivo

Fatores que Influenciam no Resultado do Experimento Animal

Antenor Andrade

Introdução

A notória contribuição dos animais de laboratório à pesquisa é atestada através dos grandes avanços na medicina e biologia. Antes de 1900, algumas espécies animais, como cães, coelhos, ovinos e aves, contribuíram para as pesquisas na busca do tratamento da raiva, varíola, do beribéri e outras.

A partir de 1900, diversas espécies animais prestaram valiosa contribuição para o tratamento de doenças, desenvolvimento de drogas (anestésicas, antidepressivas, tranqüilizantes), desenvolvimento e produção de vacinas e soros, desenvolvimento de técnicas cirúrgicas e de transplantes, descoberta de hormônios (insulina, tiroxina), descoberta do fator Rh, desenvolvimento da quimioterapia do câncer etc.

Desde 1980, a contribuição foi marcante na produção de anticorpos monoclonais, na terapia genética e no desenvolvimento de técnicas de transplantes de órgãos, assim como nas pesquisas em habilidades de comunicação e de comportamento, e na busca da cura da AIDS e da doença de Alzheimer.

Na maioria dos países do mundo, a produção e padronização dos animais de laboratório mais utilizados em pesquisas encontram-se em pleno aperfeiçoamento. Tudo converge para a aquisição de modelos genéticos – ecológica e sanitariamente definidos – solicitados para a realização dos trabalhos dos pesquisadores.

As técnicas atuais de engenharia genética e biologia molecular abriram muitos caminhos para a criação e produção desses animais. A área dos transplantes de órgãos e tecidos evolui a cada dia, bem como a produção de derivados biológicos para uso em humanos com base na obtenção de animais transgênicos. O controle das doenças hereditárias também se desenvolve dia a dia.

Os animais de laboratório são utilizados como instrumentos de medida, porém não funcionam como tais, pois possuem sistemas biológicos sensitivos afetados por fatores internos e externos.

Dessa forma, quando realizamos pesquisas em animais, devemos levar em consideração esses fatores, a fim de minimizar a variabilidade e obtermos resultados reproduzíveis.

Por que os animais de laboratório são extremamente sensíveis à influência externa? Esses animais são mamíferos homeotérmicos e realizam grande mudança no metabolismo para compensar as variações do meio ambiente externo. Essa adaptação provoca alterações na fisiologia do animal, influenciando diretamente no resultado do experimento. Assim, o pesquisador deve ter sempre em mente esses fatores e controlar todo o meio ambiente externo (macroambiente), tanto quanto possível.

Fatores Ambientais Externos

Temperatura das Salas

Em se tratando de animais homeotérmicos, eles tentam manter sua temperatura corporal constante. Dessa maneira, trocas da temperatura ambiental resultam em alterações que afetam o índice metabólico, a circulação sangüínea e o comportamento animal. Conseqüentemente, a atividade das drogas pode ser influenciada, aumentando ou diminuindo a sua toxicidade.

Convém lembrar que a temperatura dentro da gaiola (microambiente) é, normalmente, mais alta que a temperatura da sala, de acordo com o tamanho da gaiola e o número de animais no seu interior.

Trocas de Ar

Os animais de laboratório realizam uma contínua troca de água, de nutrientes e de oxigênio. Perdem, constantemente, calor, umidade, dióxido de carbono e outros produtos de metabolismo, que se acumulam no ambiente se não houver ventilação adequada.

A principal preocupação é com a concentração de amônia, que afeta o sistema respiratório, causando infecções e inibindo a atividade das enzimas hepáticas. Dessa forma, devemos considerar, também, que o nível de amônia dentro da gaiola é mais alto que no meio ambiente da sala.

Umidade Relativa

Uma vez que as espécies animais criadas e mantidas em biotérios não transpiram, elas aumentam sua média de movimentos respiratórios, perdendo calor. Entretanto, se o ar inspirado pelo animal tem umidade relativa alta, esta prejudica a habilidade do animal em ajustar a sua temperatura corporal.

Além disso, a umidade elevada estimula a produção de amônia na gaiola e, em seu interior, ela é cerca de 10% mais alta que na sala.

Dieta

A dieta constitui um fator de grande importância no experimento, uma vez que a quantidade dos nutrientes aquém ou além do requerido poderá influenciar na resposta animal. Portanto, a dieta deve ser balanceada e padronizada de acordo com a espécie animal. Além disso, deve ser isenta de contaminantes, pesticidas, herbicidas e qualquer outra substância química, assim como de metais pesados. Porém, não somente a qualidade da dieta é importante. Não podemos esquecer da quantidade, que precisa ser fornecida *ad libitum*.

Devemos atentar para o fato de que a ração mantida em um depósito não ventilado e, conseqüentemente, sob temperatura alta, estocada por longo tempo, poderá perder seus componentes essenciais, especialmente vitaminas e determinados aminoácidos.

Cama

O material mais utilizado é a maravalha (raspa de madeira); no entanto, quando feita de madeira verde, contém substância aromática que pode induzir a produção de enzimas hepáticas microssomiais em ratos e camundongos, interferindo em estudos de toxicologia.

Além disso, a madeira pode conter substâncias químicas como inseticidas e fungicidas (agrotóxicos), que afetam o animal, comprometendo o seu sistema imune.

Algumas madeiras contêm, também, uma alta atividade de uréase, a qual promove a produção de amônia. Desse modo, a esterilização da cama é altamente recomendada, uma vez que o calor destrói a uréase, mata os germes e reduz o conteúdo de resinas e óleos voláteis.

Ruído

O barulho exerce efeito negativo na criação, produção e manutenção de animais de laboratório. Barulhos altos geram ultra-som, muitas vezes inaudíveis para a espécie humana, porém captados pelos roedores.

Nas salas de animais, existem várias fontes de ultra-som, como água corrente, ranger de rodas dos carrinhos, de portas e cadeiras e de ar-condicionado, que geram pressões sonoras consideravelmente altas e irritantes para os animais.

Luz

Os animais que têm atividade noturna são sensíveis à luz de alta intensidade. Ratos albinos podem ter suas retinas danificadas e ficarem cegos quando submetidos a uma luminosidade muito intensa.

Devemos considerar, também, que existem diferenças significativas de intensidade de luz entre a gaiola e a sala de animais, bem como o tipo de gaiola utilizado (se transparente ou opaca).

Não podemos esquecer que experimentos realizados no período da noite não devem ser interrompidos com luz, uma vez que podem apresentar efeito adverso.

Ambiente Social

Bioterista

Observações de comportamento animal indicam que eles conhecem seu tratador pelo cheiro. Dessa forma, não devemos trocar o bioterista próximo do início ou durante o experimento.

Está comprovado, também, que pessoas estranhas à equipe, quando presentes no interior da sala, podem causar alterações fisiológicas significativas nos animais. Por exemplo: animais submetidos a testes de substâncias pirogênicas podem ter sua temperatura elevada, independente da substância em teste.

Grupo Social

Os roedores são animais que vivem em grupo social e estabelecem grupos estáveis que não devem ser dissociados próximo ou durante o experimento. Qualquer troca dentro do grupo determina um esforço para a formação de novos grupos.

Tamanho do Grupo

O tamanho do grupo é também muito importante e precisa estar relacionado à área disponível. Assim, o espaço requerido por diferentes espécies deve ser respeitado, uma vez que, em casos de superpopulação, haverá competição, estresse e até morte, prejudicando o resultado do experimento.

Ambiente Biológico

Infecções Virais

Infecções por microorganismos patógenos exercem forte influência em muitos experimentos. Infecções virais são de especial importância, uma vez que são difundidas e, freqüentemente, não identificadas; influenciam no sistema imune do animal, prejudicando a sua resposta.

Infecções Bacterianas

As infecções bacterianas, com freqüência, causam a morte dos animais, porém existem infecções crônicas causadas por *Pseudomonas* ou *Bordetella* que interferem, sobretudo, em pesquisas respiratórias.

Infecções Parasitárias

As infecções parasitárias (verminoses) podem causar alterações imunológicas e metabólicas no hospedeiro. Em conseqüência disso, os animais devem ser criados e mantidos sob barreiras sanitárias, com monitoramento periódico para esses organismos, a fim de se obter resultados satisfatórios.

Influência do Experimento

Medo

Não podemos esquecer que os animais são usados como instrumentos, mas não são. Seu sistema sensitivo faz com que reajam ao manuseio, ao transporte ou a qualquer mudança que lhes seja imposta, uma vez que não sabem o que realmente está ocorrendo. Dessa forma, reagem com ansiedade, pânico e até mordida se são agarrados e imobilizados.

Embora o medo provoque mudanças nos parâmetros fisiológicos, incluindo pressão sangüínea e freqüência respiratória, tais reações são causadas pelo estresse hormonal, a catecolamina.

A fim de reduzir o medo, deve-se propiciar uma gradual adaptação do animal em benefício dos resultados do experimento.

Técnica do Experimento

Diferentes técnicas induzem o animal a diferentes reações. Os resultados terão variações conforme a técnica utilizada e o tempo de exposição do animal, o que provocará maior ou menor estresse.

Transporte

Qualquer transporte causa estresse ao animal, o que significa mudanças de seus dados fisiológicos. Portanto, deve ser feito nas melhores condições e no menor tempo possível.

Fatores Ambientais Internos

Padrão Genético

O resultado do experimento depende da linhagem utilizada. Assim, deve-se obedecer ao padrão genético específico para determinado trabalho. Alguns trabalhos exigem animais consangüíneos e outros não-consangüíneos, o que é definido por meio de protocolos experimentais.

Sexo

Machos e fêmeas reagem de forma diferente em presença de determinadas drogas. Entretanto, testes de toxicidade podem ser feitos em ambos os sexos sem problema.

As fêmeas necessitam de mais tempo que os machos para se recuperar após a aplicação de pentobarbital sódico. O ciclo estral pode influenciar no resultado dos testes, uma vez que nessa fase a fêmea libera grande quantidade de hormônios.

Idade

A atividade das drogas no organismo varia conforme a idade do animal. A atividade das enzimas hepáticas decresce em animais mais velhos.

Dessa forma, a idade é um fator preponderante que deve ser levado em consideração de acordo com o trabalho a ser realizado.

Variações Circadianas

Presume-se que exista uma estrutura ou função no corpo do animal que esteja estreitamente ligada ao ritmo circadiano; quando este sofre variações, há uma séria interferência no experimento.

Sabemos que o estímulo da luz produz variações nos níveis hormonais dos animais; assim, o ciclo reprodutivo de muitas espécies é controlado pelo ritmo circadiano (duração do dia) que lhe é imposto.

Trabalhos comprovam que a mesma dosagem de uma determinada droga aplicada na mesma espécie animal em horas diferentes tem efeito desigual. Portanto, em pesquisas, a hora de um experimento deve ser especificada, e, caso inoculações sejam feitas repetidamente, estas devem ocorrer sempre na mesma hora do dia.

Conclusão

Os animais de laboratório não podem escapar das condições que lhes oferecemos, no que se refere aos fatores aqui abordados. Assim, sabedores de que eles reagem diferentemente a cada estímulo e necessitam de determinado tempo para adaptação às variações que lhes são impostas, devemos levar em consideração o quanto são sensíveis e o quanto devemos manuseá-los cuidadosamente para assegurar a sua saúde e a experimentação.

Bibliografia

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.

Stephens, U. K. & Paton, N. M. (Eds.). *Manual for Laboratory Animal Technicians*. USA: Ed. The American Association for Laboratory Animal Science, 1984.

Saiz Moreno, L.; Garcia de Osma, J. L. & Compaire Fernandez, C. *Animales de Laboratorio: producción, manejo y control sanitario*. Madrid: Instituto Nacional de Investigações Agrárias/Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1983.

Técnicas de Risco Desenvolvidas na Experimentação com Roedores

Octavio Augusto França Presgrave

Introdução

A maioria dos desenhos experimentais, sejam eles utilizados no desenvolvimento de novas drogas, sejam no controle da qualidade de produtos acabados, utiliza animais de laboratório, sendo os mais comuns os roedores (ratos, camundongos etc.) e os lagomorfos (coelhos).

Quando lidamos com esses animais, temos de ter em mente não apenas a proteção dos mesmos como também a nossa própria proteção, e ainda, os resultados a serem obtidos. Os requisitos dessa proteção independem do padrão sanitário dos animais utilizados nos experimentos; todos os procedimentos e cuidados que se seguem devem, obrigatoriamente, ser usados em qualquer tipo e etapa do manuseio com os animais.

Às vezes, torna-se muito repetitivo quando se fala em biossegurança, medidas de proteção etc., tendo em vista que, quase sempre, essas regras, normas e conceitos se aplicam em vários casos, sempre da mesma forma. Até mesmo porque muitas das medidas de proteção não se referem somente ao uso desses animais ou de quaisquer outros e, sim, tratam de medidas que se devem tomar para qualquer tipo de trabalho no laboratório.

Os principais riscos que corremos quando trabalhamos com roedores e lagomorfos, reside na possibilidade de ocorrência de mordidas e arranhões. Obviamente que, como conseqüência disso, podemos sofrer algum tipo de contaminação, dependendo do material com que estamos administrando os animais. Apesar de geralmente estarmos trabalhando com animais convencionais controlados ou outro padrão sanitário superior, não podemos afastar o risco de uma contaminação veiculada pelo próprio animal. Isso se torna mais claro no trabalho com animais silvestres.

Todo trabalho conduzido com animais de laboratório deve ser feito com o uso obrigatório de EPIs (Equipamentos de Proteção Individual) e, sempre que exigido, EPCs (Equipamentos de Proteção Coletiva), conforme descrito a seguir.

Equipamentos de Proteção Individual

LUVAS – essenciais para a proteção das mãos, evitando o contato com urina e fezes desses animais, excretas essas que podem ser carreadoras de microorganismos provenientes da administração ou metabólitos de substâncias injetadas, com potencial risco de danos à saúde do manipulador ou de quem lida com este diretamente, sejam colegas de trabalho, sejam familiares. O uso de luvas impede a disseminação de contaminantes, uma vez que as mesmas devem ser retiradas e descartadas quando não se está em operação com os animais, evitando assim que portas, maçanetas e diversos outros objetos sejam contaminados.
As luvas normais (de látex) podem não ser uma boa proteção contra mordeduras de roedores maiores ou arranhaduras de lagomorfos. Para tal, existe um tipo de luva, confeccionada de nitrila, que é mais resistente,

principalmente quando trabalhamos com coelhos. Uma alternativa, na falta das luvas de nitrila, pode ser o uso de duas luvas sobrepostas.
Em alguns casos, pode-se utilizar luvas mais grossas para manusear os animais. O importante é que elas mantenham o tato a fim de evitar que se machuquem os animais, quando da sua contenção.

óculos de proteção ou protetor facial – muito útil para se evitar respingos de urina, sangue ou até mesmo de microorganismo ou substâncias que estejam sendo manipuladas.

máscara cirúrgica – existem diversos tipos: normal, classe 100, para pessoas com barba, de pano, descartáveis etc. Cada uma se destina a um tipo de situação distinta, embora a finalidade de proteção quanto à inalação de partículas seja essencialmente a mesma.

gorros – também existem alguns tipos distintos: masculino, feminino, tipo escafandro etc. Útil para evitar carrear qualquer tipo de contaminação pelos cabelos, além de evitar que a possível queda de cabelos venha a contaminar o experimento.

sapatilhas – servem tanto para impedir que sujidades e contaminantes sejam carreados pelos sapatos para dentro da sala de experimentação quanto para fora dela. Existem sapatilhas de diversos materiais (de pano ou descartáveis) e tipos (desde as que cobrem somente os sapatos até as do tipo botas).

jaleco e avental cirúrgico – úteis na proteção geral das roupas, membros, tórax etc. Existem aventais cirúrgicos de diversos materiais: tecido, descartáveis, autoclaváveis (por certo número de vezes e depois descartados) etc. É importante que o avental seja descartado (lixo ou lavanderia) ao sair da área de experimentação. Em alguns casos, pode ser necessário o uso de uniforme completo, composto de calça, camisa etc., podendo ser inteiriços ou não, dependendo da atividade executada.

Equipamentos de Proteção Coletiva

Além dos EPCs de uso geral (extintores de incêndio, chuveiros etc.) cuja aplicação não se detém somente ao uso com animais, existem alguns que podem (e devem) ser utilizados na experimentação.

capela de fluxo laminar – especialmente útil para o uso na experimentação com animais SPF (*Specific Pathogen Free*). Após a retirada da caixa com os animais do microisolador, procede-se ao manejo experimental dentro da capela de fluxo laminar. Esse procedimento garante o ambiente de proteção para os animais.
Esse EPC é de grande utilidade na realização de necropsias e manipulação de animais contaminados e/ou de procedência desconhecida.

capela de exaustão ou capela química – recomendada para o uso no sacrifício de animais quando do fim da utilização dos mesmos na experimentação, seja com a utilização de anestésicos voláteis (éter, clorofórmio), seja com CO_2 (mais recomendado atualmente). Em ambos os casos, os animais são sacrificados em uma câmara situada dentro da capela.

Equipamentos/Dispositivos Adicionais

caixa para descarte de material perfurocortante – são caixas especiais, em papelão resistente, com símbolos e avisos, própria para o descarte de agulhas, seringas, vidros, lâminas etc., com abertura que somente permite a entrada do material. Após atingirem uma determinada marca, são lacradas e autoclavadas.

PULVERIZADOR DE AGULHAS – transforma a agulha em minúsculas partículas (limalha), quando esta é colocada em contato com a placa eletrificada no aparelho. Equipamento extremamente polêmico, uma vez que no ato da pulverização produz aerossóis.

Recomendações Importantes

- jamais trabalhe sozinho no laboratório;
- jamais trabalhe com roedores e lagomorfos (ou outros animais) em situações de debilidade de saúde, cortes nas mãos, rosto ou qualquer outra área exposta;
- sempre lave e desinfete as mãos e antebraços após o trabalho com animais (mesmo com a utilização de luvas e demais EPIs);
- sempre limpe e desinfete a bancada de trabalho após o término do experimento;
- sempre trabalhe com ética.

Bibliografia

GRIST, N. R. *Manual de Biossegurança para o Laboratório*. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1997.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Biosafety in the Laboratory*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1989.

TEIXEIRA, P. & VALLE, S. *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1996.

Controle da Qualidade de Animais de Laboratório

Celia Virginia Pereira Cardoso

Introdução

Há mais de 50 anos foram reconhecidos os 'agentes infecciosos' que davam origem às doenças dos animais de laboratório e interferiam em suas respostas biológicas. Surgiram, então, as técnicas de barreiras nas instalações e o início da criação de animais livres de microorganismos indesejáveis.

Junto com essa evolução apareceram, também, outras necessidades como a igualdade de condições na manutenção dos animais de um biotério para outro e a elaboração de um 'programa de monitorização da saúde' para confirmação da presença ou não de certos agentes.

Antes de tratarmos do programa de monitorização da saúde, que se constitui no 'controle da qualidade sanitária' dos animais de laboratório, é importante conhecermos a classificação dos agentes infecciosos, baseada na sua probabilidade de detecção ou prevalência.

Agentes infecciosos primários – são aqueles com significante potencial de causador de doenças, conhecida interferência na pesquisa, 'alta' probabilidade de detecção ou prevalência e bom potencial para exclusão através de técnicas de produção de barreiras. Exemplo: vírus da hepatite murina (MHV); vírus *Sendai*; *Salmonella* sp etc.

Agentes infecciosos oportunistas – são aqueles comuns no meio ambiente dos animais de laboratório e/ou do homem e tem 'baixa' probabilidade clínica como causador de doenças. Geralmente, têm um alto potencial de latência e são carreados pelo homem. Exemplo: *Klebsiella pulmoniae, Pasteurella pneumotropica, Staphylococcus aureus* etc.

Agentes infecciosos mistos – são aqueles cujo papel como oportunista ou patógeno é limitado ou inexistente.

A realização do controle da qualidade sanitária é limitante quando se trata de animais de laboratório convencionais ou holoxênicos, ou seja, aqueles que possuem microbiota indefinida por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas.

A 'monitorização genética' e o 'controle sanitário e físico-químico do meio ambiente' também são ações imprescindíveis na realização do controle da qualidade dos animais de laboratório.

Programa de Monitorização da Saúde

O primeiro passo é estabelecer uma rotina de monitorização. Amostragens regulares ajudam a provar a existência de um agente em pelo menos um animal.

A confirmação de um resultado positivo deve ocorrer com a repetição do exame e o emprego de métodos diferentes.

A 'freqüência da amostragem' varia de acordo com vários fatores, tais como importância do agente, confiabilidade nos vários processos empregados, tipo de instalações onde os animais são mantidos, tipos de equipamentos e pessoal, introdução de materiais e/ou animal e produção de anticorpos (de 10 a 14 dias no animal).

O 'tamanho da amostra' de uma população, com mais de cem animais e onde se pode estimar um percentual de infecção, é determinado pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{LOG } 0{,}05}{\text{LOG N}} = \text{número da amostra}$$

Onde N = percentagem de animais não-infectados na população.
Log 0,05 = 95% de nível confiável.

Em média, nas produções fechadas, as doenças virais produzem morbidade de 30% a 35%. A seguir, temos uma tabela que indica o tamanho da amostra que devemos utilizar em virtude da incidência de infecção na população.

Tabela 1 – Tamanho da amostra requerida para detectar pelo menos um animal positivo com 95% de confiabilidade

EXPECTATIVA DA INCIDÊNCIA DE INFECÇÃO NA POPULAÇÃO (%)	TAMANHO DA AMOSTRA
90	2
80	2
70	3
60	4
50	5
40	6
30	9
20	14
10	29
1	298

Fonte: De Luca et al. (1996).

Segundo recomendações da Federation of European Laboratory Animal Science Associations (Felasa), pode-se empregar também os seguintes esquemas em colônias microbiologicamente controladas:

Quadro 1 – Colônias de camundongos, ratos, *hamsters* e cobaias

FREQÜÊNCIA DA AMOSTRAGEM	TAMANHO DA AMOSTRA		TESTE/ANIMAL			
	Idade	nº de animais	Sorologia	Bacteriologia	Parasitologia	Patologia
A cada 3 meses	Recém-desmamado	> 2	-	+	+	+
	10-14 semanas (adulto jovem)	> 4	+	+	+	+
	> 6 meses (descarte)	> 4	+	+	+	+

Fonte: Federation of European Laboratory Animal Science Associations (Felasa).

Quadro 2 – Colônias de coelhos

FREQÜÊNCIA DA AMOSTRAGEM	TAMANHO DA AMOSTRA		TESTE/ANIMAL			
	Idade	nº de animais	Sorologia	Bacteriologia	Parasilogia	Patologia
A cada 6 meses	12-14 semanas (adulto jovem)	> 4	+	+	+	+
	> 6 meses (descarte)	> 4	+	+	+	+

Fonte: Federation of European Laboratory Animal Science Associations (Felasa), 1994/1996.

O emprego de 'animais-sentinela' é muito eficaz e traz excelentes resultados, principalmente quando utilizado nas salas de animais em experimentação. Eles são imunocompetentes criados, direta ou indiretamente, com a população de animais a ser monitorada. Diretamente, é junto com o animal na mesma gaiola e indiretamente – e mais usado – é em gaiolas com a cama usada por outro animal.

Os animais-sentinela devem ser testados antes para confirmação da ausência dos agentes em questão. O controle é mais eficaz usando-se animais de mesma espécie e cepa da população residente; devem ter pelo menos dez semanas de idade e ser mantidos dentro da sala por, no mínimo, quatro semanas.

O diagnóstico para determinação do *status* sanitário, da causa de uma doença clínica ou da morte do animal se obtém mediante o emprego da parasitologia, da bacteriologia, da micologia, da virologia, do estudo do micoplasma, das rickéttsias e da patologia.

Devemos enfatizar que os resultados negativos significam apenas que o microorganismo monitorado não foi demonstrado nos animais utilizados para o teste. Os resultados não são, necessariamente, reflexo do *status* de todos os animais de uma unidade de criação.

Um agente infeccioso deve ser declarado como presente se ele é identificado ou anticorpos para ele são detectados em um ou mais animais testados. Os resultados devem continuar sendo reportados como positivo nos testes subseqüentes até que o organismo tenha sido erradicado da colônia por meios de derivação ou reposição de animais de origem externa.

Os procedimentos laboratoriais para obtenção do diagnóstico devem seguir os princípios da GLP (*Good Laboratory Practice*), onde couber, e participar de um Programa de Garantia da Qualidade.

O resultado final dos testes de parasitologia, bacteriologia, micologia, micoplasma e virologia deve mencionar os organismos de importância de cada um deles e indicar, de acordo com cada espécie dos animais de laboratório, aqueles que foram detectados ou não (número de animais positivos), ou se não foram testados (NT).

O resultado final dos testes de patologia deve complementar a monitorização da saúde dos animais de laboratório.

Programa de Monitorização Genética

O controle genético é fundamental na definição do *status* genético de uma colônia de animais de laboratório e faz parte do controle da qualidade da colônia como um todo.

Por se tratar de um tema com muitas peculiaridades, este livro dedica um capítulo exclusivamente sobre ele.

Controle Sanitário e Físico-Químico do Meio Ambiente

Todo e qualquer biotério deve manter as condições mínimas de higiene em seu meio ambiente. Porém, os biotérios destinados à manutenção de animais SPF ou gnotobióticos são obrigados a cumprir essa exigência sob pena de invalidar todo o trabalho nele desenvolvido.

Para se certificar do pleno cumprimento dessa obrigação, são realizados os testes de controle sanitário e físico-químico do meio ambiente dos biotérios.

O controle de vetores é uma providência importante, já que todo biotério possui o que há de mais atraente para roedores selvagens, que é a presença de ração (em alguns casos, em abundância) com odores bastante característicos. Da mesma forma, os insetos, rasteiros ou não, são uma ameaça e, por conta disso, um bom programa de desratização e desinsetização deve ser adotado para eficiência do sistema.

Alguns cuidados devem ser observados nessa prática, uma vez que as iscas ou produtos inseticidas têm cheiros que podem vir a atrair (e intoxicar) os próprios animais do biotério, principalmente aqueles que se mantêm em áreas abertas (nos gaiolões, piquetes ou canis). Deve-se sempre manter uma boa distância entre as iscas e o acesso dos animais, para se evitar problemas.

Nas áreas de estoque de ração e maravalha, o uso de inseticidas por pulverização é desaconselhável. As salas de animais também devem ser excluídas do programa.

Os testes microbiológicos se limitam, sobretudo, aos de bacteriologia e micologia. Eles são adotados em todo o meio ambiente, envolvendo as salas (parede, teto, piso, ar filtrado, estante, mesa de serviço, luminárias, maçanetas etc.), salas de estoque de material limpo, equipamentos e insumos. O material é coletado através de *swabs* e/ou placas com meios de cultura e são cultivados até a obtenção do diagnóstico final.

A freqüência desses testes é de quinze dias para um ambiente SPF e de uma semana para o gnotobiótico. Em um ambiente de biotério convencional, essa prática é adotada apenas quando se faz a desinfecção do ambiente das salas de animais, com o intuito de avaliar a eficácia do desinfetante utilizado. E isso acontece, desejavelmente, a cada três meses.

Os testes físico-químicos são destinados, basicamente, aos desinfetantes, detergentes, produtos químicos e rações utilizados nos biotérios.

Na aquisição dos desinfetantes, detergentes e produtos químicos, os testes físico-químicos devem ser realizados para se certificar da qualidade dos produtos.

Da mesma forma, a cada partida de ração recebida pelo biotério, não só os testes físico-químicos, como também os microbiológicos, devem ser realizados.

Referências Bibliográficas

De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Federation of European Laboratory Animal Science Associations (Felasa). *Recommendations for the Health Monitoring Mouse, Rat, Hamster, Guineapig and Rabbit Breeding Colonies.* London: Felasa, 1994/1996.

Bibliografia

Canadian Council on Animal Care (Ccac). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.-

Jalmes, C. A. C. et al. *Control de Calidad de Animales de Laboratorio.* Caracas: INHRR, 1997.

35

Controle Parasitológico

Marcos Antônio Pereira Marques

Introdução

Nas colônias de animais de laboratório convencionais, a incidência de parasitas é constante, provocando várias alterações nutricionais. Isso interfere no desenvolvimento do animal e pode, em casos especiais, até alterar bruscamente a fisiologia animal. Hoje em dia, as colônias convencionais utilizam drogas antiparasitárias para o controle e a erradicação de parasitas. As técnicas de cesariana e histerectomia têm auxiliado na obtenção de animais sanitariamente definidos.

Os animais devem ser escolhidos aleatória e periodicamente, e com uma amostragem não inferior a dez animais por sala de criação, variando as idades. A escolha dos métodos parasitológicos é de fundamental importância no diagnóstico das principais parasitoses de roedores. Para a confirmação de endoparasitos, além do exame parasitológico das fezes, através de métodos clássicos, também deve ser feita a investigação direta da mucosa intestinal, após o sacrifício animal, na qual os parasitos são investigados diretamente na região do ceco, jejuno e íleo.

O exame parasitológico compreende duas etapas distintas: pesquisa de ecto e de endoparasitos.

Exame Parasitológico das Fezes

Tem como objetivo a pesquisa de ovos, larvas e cistos de protozoários. As fezes devem ser coletadas diretamente da mucosa anal, estando assim livres de impurezas, e devem ser manipuladas num período máximo de 4 horas, após o qual será necessário o uso de conservantes para a preservação do material (MIF 1:2).

O exame parasitológico, bem como a investigação direta da mucosa intestinal, deve ser realizado em três etapas:

Exame macroscópico – visualização a olho nu, em fundo preto, observando a presença de larvas de helmintos, proglotes de cestódeos. Nesse exame também observamos a coloração e a consistência das fezes;

Exame microscópico – realizado através de métodos específicos que determinam, com maior precisão, a realidade da infecção, dando uma visão mais ampla do parasito;

Exame direto da mucosa intestinal – é uma prática realizada em nosso Serviço de Controle da Qualidade Animal, que vem apresentando resultados satisfatórios, visando à pesquisa do parasito no seu hábitat natural. Após o sacrifício do animal, é retirado o intestino, sendo colocado em duas placas de Petri (ceco/jejuno/íleo) com salina fisiológica.

O material é examinado primeiramente a olho nu, contra um fundo negro e, posteriormente, uma pequena amostra é examinada ao microscópico para pesquisa de ovos e cistos de protozoários.

Principais Helmintos Encontrados em Colônias Convencionais

Syphacia obvelata

Endoparasito pertencente à família Oxyuridae, presente em quase todas as criações convencionais de camundongos, ratos e *hamsters*. Esse nematódeo habita o ceco, apresentando ciclo biológico direto, que se completa a cada 15 dias. A fêmea grávida migra até a região perianal, onde deposita ovos que se tornam infectantes após 6 horas. A ingestão por outros animais ou a migração da própria larva para o ceco inicia um novo ciclo biológico. Seus ovos apresentam aspecto reniforme.

A infecção causada por *Syphacia obvelata* (Fig. 1.2) é considerada subclínica; porém, é de importância vital registrar que, quando a infestação de uma colônia por *S. obvelata* for grande, geralmente aumenta o número de animais apresentando prolapso de reto.

A cesariana e a histerectomia são métodos eficazes na erradicação desse parasito nas colônias de roedores. A transmissão pode ser reduzida com a utilização de filtros de caixa.

A larva de *Syphacia muris* é semelhante a *S. obvelata*, ocorrendo freqüentemente em colônias convencionais de ratos.

Aspiculuris tetraptera

Endoparasito pertencente à ordem Ascarida, família Oxyuridae, amplamente distribuído em colônias de roedores convencionais, parasitando o ceco de camundongos e, raramente, ratos. *Aspiculuris tretaptera* (Fig. 1.3) é considerado um parasito não-patogênico.

Apresenta ciclo biológico direto. Os ovos são eliminados com as fezes e requerem de 6 a 8 dias de incubação, em temperatura ambiente, antes de se tornarem infectantes. A transmissão ocorre quando ovos embrionados são ingeridos. Os ovos eclodem no intestino, liberando as larvas que, em torno de 25 dias, tornam-se adultas, reiniciando o ciclo biológico. Os ovos de *Aspiculuris tretaptera* apresentam simetria elipsoidal com parede fina e são resistentes ao frio.

Nippostrongylus brasiliensis

Nematódeo pertencente à família Trichostrongylidae (Fig. 1.1). Raramente é encontrado no intestino delgado de camundongos e ratos de laboratório, mas, freqüentemente, em roedores silvestres. Os vermes adultos apresentam aspecto filiforme com coloração avermelhada, medindo os machos 5mm e 6 mm de comprimento e as fêmeas, um pouco maiores, 8mm a 9 mm. O ovo apresenta forma elipsóide. Apresenta ciclo biológico direto e, 24 horas após a eclosão dos ovos, a larva se torna infectante. A transmissão pode ocorrer pela ingestão de ovos embrionados, sendo mais comum a penetração através da pele do animal. As larvas circulam pelos pulmões, passando para os brônquios, de onde são expelidas pela tosse e deglutidas; passam para o aparelho digestivo (ciclo de Loss) no qual, após 4 a 6 dias, tornam-se adultas e reiniciam o ciclo biológico.

O manejo adequado com freqüentes trocas de caixa é um meio eficaz para interromper o ciclo desse parasito.

Hymenolepis nana

Também designada como *Vampirolepis nana* (Fig. 1.4), cestódeo pertencente à família Hymenolepideae, é normalmente encontrada em colônias convencionais de camundongos, ratos e, sobretudo, *hamsters*. Considerado um parasito não-patogênico, podendo ocasionalmente causar doença no hospedeiro, de acordo

com o grau de infestação. Quando o animal apresenta alto grau de infestação, podemos observar perda de peso e, em conseqüência, baixa absorção nutricional. Esse parasito pode apresentar ciclo direto e indireto.

O ciclo indireto exige um inseto, no qual ocorre o desenvolvimento de cisticercos. O ciclo direto ocorre através das proglotes maduras eliminadas pelo animal. No ciclo direto, os cistercercóides podem ser encontrados no animal, após 14 dias, na mucosa intestinal, de onde migram para o jejuno e íleo. Os ovos apresentam, em seu interior, um embrião resistente, podendo sobreviver meses nas fezes do hospedeiro. Levando-se em consideração o tempo, o ciclo biológico indireto completa-se em 25 a 30 dias, ao passo que para o ciclo biológico direto são necessários apenas 16 dias.

Taenia taeniaformis e *Taenia psiformis*

Estes cestódeos pertencentes à espécie *Taenia taeniaformis* (Fig. 1.5) têm como hospedeiros intermediários ratos, camundongos e *hamsters*, e a espécie *Taenia psiformis*, os coelhos. As larvas se instalam no fígado, onde se desenvolvem.

Passalurus ambiguus

Endoparasito pertencente à família Oxyuridae comumente encontrado em colônias convencionais, parasitando o ceco e o colo de coelhos. Esse nematódeo apresenta ciclo direto, dando-se a transmissão por meio da ingestão de ovos embrionados. O *Passarulus ambiguus* (Fig. 1.6) é um parasito não-patogênico, não sendo atribuído a ele distúrbios intestinais, tais como diarréia e enterite.

Paraspidodera uncinata

Este helminto é o único nematódeo de importância presente em colônias convencionais de cobaia. A larva de *Paraspidodera uncinata* (Fig. 1.7) habita o ceco e o colo de cobaias, eliminando seus ovos pelas fezes, que necessitam de 3 a 5 dias para se tornarem infestantes. Quando ingeridos, os ovos eclodem e as larvas migram até o ceco e colo, tornando-se adultas em 45 dias, reiniciando o ciclo. Esse nematódeo é considerado não-patogênico; porém, a perda de peso e o retardamento do desenvolvimento do animal têm sido atribuídos à alta infestação desse parasito.

Principais Protozoários Encontrados em Colônias Convencionais

Giardia muris

Protozoário flagelado, pertencente à família Hexamitidae, subfamília Giardinae. As formas trofozoítas desse gênero (Fig. 1.8) apresentam aspecto periforme, dois núcleos, quatro pares de flagelos e habitam o intestino delgado de várias espécies de animais convencionais. O parasito se liga às células epiteliais da mucosa intestinal através de um disco suctorial. O protozoário *Giardia muris* pode infectar camundongos, ratos e *hamsters*. A infecção geralmente é subclínica; entretanto, podemos observar que os animais apresentam perda de peso, pêlos eriçados e distensão abdominal com intensa produção de gases. O trofozoíto de *G. muris* apresenta ciclo biológico direto e a transmissão se dá por ingestão dos cistos. O protozoário se reproduz por divisão longitudinal. A dose mínima infectante para um camundongo é de aproximadamente dez cistos.

Hexamita muris

Protozoário flagelado, pertencente à família Hexamitidae, finalmente chamado de *Hexamita muris* (conhecido também por *Spironucleus muris*) (Fig. 1.9). Encontrado no intestino delgado, principalmente no duodeno de camundongos, ratos e *hamsters*.

Apresenta aspecto periforme com simetria bilateral, contendo dois grupos de flagelos na região anterior e dois flagelos na extremidade inferior. O trofozoíto de *Hexamita muris* apresenta ciclo biológico direto e a reprodução se dá por divisão longitudinal binária.

Esse parasito ocasiona uma enfermidade aguda e crônica. A forma mais grave ocorre em camundongos lactentes, podendo levá-los à morte. A fase inicial aguda da enfermidade se manifesta por diarréia e perda de peso. Essa conduz a uma enfermidade crônica, com persistente perda de peso e desenvolvimento. Em ambas as formas, aguda e crônica, os cistos aderidos às criptas da mucosa duodenal ocasionam uma forte resposta inflamatória (enterite).

Tritrichomonas muris

Protozoário flagelado, não-patogênico, pertencente à classe Mastigophora, habitante comum do ceco e colo de camundongos, ratos e *hamsters*. Apresentam aspecto piriforme, com um único núcleo, três flagelos na região apical e uma membrana ondularmente que percorre a extensão longitudinal do parasito, exteriorizando-se como flagelo livre (Fig. 2.0). Seu ciclo biológico é simples e direto. O trofozoíto é eliminado com as fezes, dificilmente formando cisto. Apresenta reprodução por divisão longitudinal binária. Quando em grande quantidade pode ocasionar diarréia no hospedeiro.

Entamoeba muris

Protozoário pertencente à classe Sarcodina, família Entamoebidae. Parasito de distribuição cosmopolita, semelhante a *Entamoeba coli* do homem (Fig. 2.3). Reproduzem-se por divisão binária, sendo os cistos a forma infectante do parasito. Apresenta forma esférica, contendo oito núcleos e ciclo biológico direto, pela ingestão de cistos, que se rompem no duodeno. Finalmente, as amebas colonizam o ceco e colo, onde levam uma existência parasitária não-patogênica. As várias espécies são:

- *E. muris* – ceco e cisto de camundongo.
- *E. caviae* – ceco e colo de cobaias.
- *E. cuniculi* – ceco e colo de coelhos.

Balantidium caviae

Parasita pertencente à classe Ciliata, aparentemente não-patogênico, habita o ceco e colo de cobaias mantidas em colônias convencionais. Esse parasita apresenta duas formas básicas: trofozoíto e cisto (Fig. 2.2). O trofozoíto tem o corpo recoberto por cílios, com várias organelas, vacúolos digestivos e dois núcleos: o macro e o micronúcleo. A transmissão se dá pela ingestão de cistos que contaminam alimentos e água. Divide-se por fissão binária ou conjugação. É normalmente um protozoário comensal do intestino, alimentando-se de amido e bactérias.

Eimeria sp

É um coccídeo patogênico que pode infectar o intestino delgado e o ceco de camundongos, ratos, cobaias e coelhos. Os oocistos esporulados podem ser de formas variadas: elipsóides, esféricos, ovóides, de tamanho

variável segundo a espécie parasitada. Os oocistos apresentam 4 esporocistos contendo 2 esporozoítos cada um e uma abertura anterior denominada micrópila. Quando em grandes quantidades, produzem uma infecção grave com comprometimento do epitélio intestinal com perda de sangue e água, levando o animal à desidratação e posteriormente à morte. As eimerias possuem várias espécies:

- *E. separata* (Fig. 2.1 a) – habita o intestino do rato.
- *E. caviae* (Fig. 2.1 b) – habita o intestino da cobaia.
- *E. falciformis* (Fig. 2.1 c) – habita o intestino do camundongo.
- *E. stiedai* (Fig. 2.1 d) – habita o intestino do coelho.

Ectoparasitos

A pesquisa de ectoparasitos, na pelagem do animal, é de fundamental importância na criação, visto que podem atuar como vetores de microorganismos patogênicos, desencadeando processos infecciosos diversos. Algumas espécies são hematófagas, outras são esfoliadoras e podem causar sérios problemas na epiderme. Em ambos os casos ocorrem alterações nos resultados da pesquisa, seja pelo efeito do parasitismo, que pode ser confundido com os resultados dos experimentos, seja porque o estresse, provocado pelo experimento, pode intensificar os efeitos da parasitose. Portanto, as ectoparasitoses devem ser diferenciadas de outras infecções com possibilidade de ocasionar lesões epidérmicas similares.

Pesquisa de Ectoparasitos

Utilizando-se de microscópio entomológico, deve-se examinar a pelagem do animal, visando à procura de parasitos de maior tamanho (piolhos) e de ácaros menores (sarnas).

Após o sacrifício, o animal deve ser colocado sobre um fundo preto, com bordas revestidas e fitas adesivas (para cima) para fixar os parasitos que migram do corpo do animal.

Em nosso Serviço de Controle da Qualidade, após a eutanásia, a carcaça do animal é colocada diretamente sob focos de luz, durante 60 minutos, após o qual pode-se observar a migração dos parasitos através da lupa ou do microscópico entomológico.

Pode-se também diminuir esse tempo para 30 minutos, colocando-se a carcaça do animal dentro de um refrigerador. Com o frio, os parasitos migram para a superfície dos pêlos na tentativa de encontrar outro hospedeiro, sendo facilmente observados a olho nu contra fundo negro ou com ajuda da lupa.

Principais Ectoparasitos de Colônias Convencionais

Piolhos

Poliplax serrata

É um piolho de camundongos que pode ser visto a olho nu. Apresenta coloração amarelada com traços de marrom. Seus ovos são fixados na base dos pêlos do abdômen e do colo.

Seu ciclo biológico pode completar-se em 13 dias. O piolho *Poliplax serrata* (Fig. 2.4) transmite, diretamente ou mediante traumatismos da pele que o próprio camundongo faz ao coçar-se, um protozoário parasita do sangue, *Eperythozoon coccoides*.

Gliricola porcelli e *Gyropus ovalis*

Ectoparasitos comumente encontrados em colônias convencionais de cobaias. Quando em grande quantidade podem ser observados nas cobaias a olho nu, dando a impressão de 'sujeiras' no pêlo, principalmente no dorso do animal. Não são patogênicos; porém, quando em grande quantidade, o animal pode apresentar esfoliações na epiderme e alopécia. Geralmente quando uma colônia está parasitada, encontramos as duas espécies de piolhos. Podemos diferenciá-las pelas seguintes observações:

• *Gliricola porcelli* (Fig. 2.6) – patas curtas com corpo 'alongado', apresentando coloração amarelada ou ocre.
• *Gyropus ovalis* (Fig. 2.5) – possui coloração clara, apresenta abdômen 'arredondado' com finos pêlos dorsais.

Haemodipsus ventricosus

Raramente encontrado em colônias convencionais de coelhos, o piolho *Haemodipsus venticosus* (Fig. 2.7) localiza-se preferencialmente no dorso e na região pélvica do animal. Tem coloração castanha, apresentando cabeça e patas pequenas, enorme abdômen oval e pêlos na região ventral e dorsal.

Ácaros

Myobia musculi

Ectoparasita geralmente encontrado em colônias convencionais de camundongos, sendo principal ectoparasito dos camundongos e o mais difícil de se eliminar. *Myobia musculi* (Fig. 2.8) vive na superfície cutânea e nos pêlos da região da cabeça, pescoço e nuca. Apresenta o primeiro par de patas pequeno e especialmente modificado para fixação ao pêlo. Quando em grandes quantidades, podem ocorrer pruridos e escoriações da epiderme resultantes de infecções secundárias, provocados pelo próprio animal ao coçar-se.

Myocoptes musculinus

Parasita cosmopolita de camundongos mantido em colônias convencionais. Aparentemente não-patogênico; porém, quando há grandes infestações, podemos observar alopécia e prurido, geralmente na região do pescoço e da nuca, e em alguns casos podemos encontrá-lo em toda a superfície do corpo.

A transmissão de *Myocoptes musculinus* (Fig. 2.9) se dá por contato direto, e seu ciclo biológico ocorre totalmente na pelagem, num período de 14 dias.

Notoedres muris

Responsável pela sarna auricular de ratos (específico do gênero *Rattus*). A infestação por *Notoedres muris* (Fig. 3.0) é caracterizada pelo aparecimento de lesões na orelha e no focinho do animal. As fêmeas liberam seus ovos em galerias no extrato córneo. O ciclo biológico se completa com 19 dias, sendo a transmissão realizada por contacto direto.

Psoroptes cuniculli

Ectoparasito encontrado comumente em criações de coelhos convencionais, conhecido também por sarna auricular dos coelhos, visto que o sítio de infestações localiza-se na base das crostas, onde se passa todo o ciclo biológico do parasito com duração de 21 dias. Os ovos de *Psoroptes cuniculli* (Fig. 3.1) liberados permanecem viáveis pelo menos por um mês em temperatura ambiente. Para um tratamento eficiente, é necessária a remoção da crosta, seguida de limpeza da área, sendo então aplicados os medicamentos tópicos, com intervalos de 3 a 5 dias. Podemos também encontrar esse tipo de sarna no focinho e nas patas do animal. A fêmea é relativamente grande em relação ao macho, apresentando nas regiões laterais e terminais um longo par de espinhos e quatro pares de patas.

Chirosdicoides caviae

Ectoparasito geralmente encontrado em colônias convencionais de cobaias, parasitando geralmente a região dorsal do hospedeiro, podendo ser encontrado por todo o corpo do animal. Em casos de grandes infestações por *Chirosdicoides caviae* (Fig. 3.2), podemos encontrar alopécia e prurido. As fêmeas e os machos apresentam corpos alongados com o primeiro par de patas modificados para fixar-se ao pêlo.

Figuras

Figura 1.1

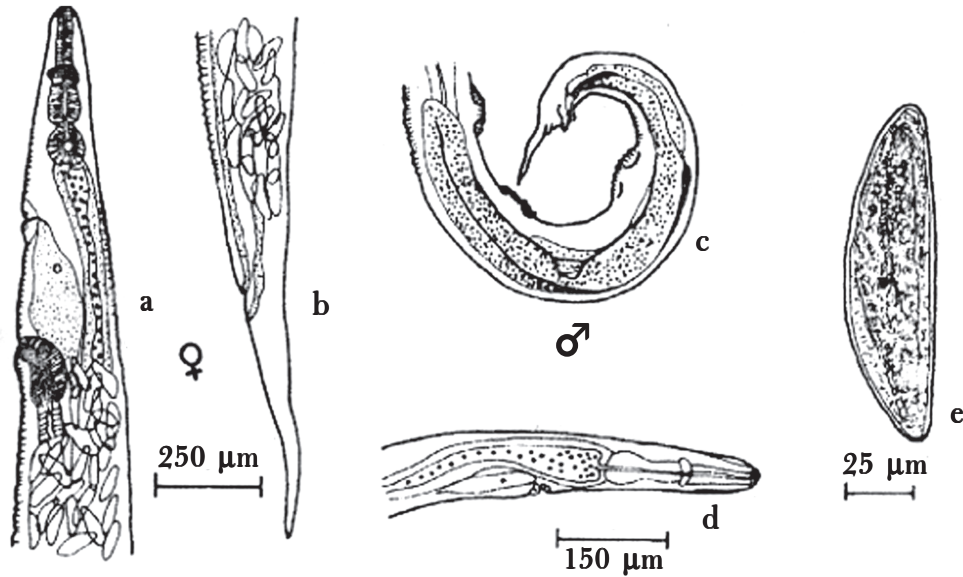



Figura 1.2

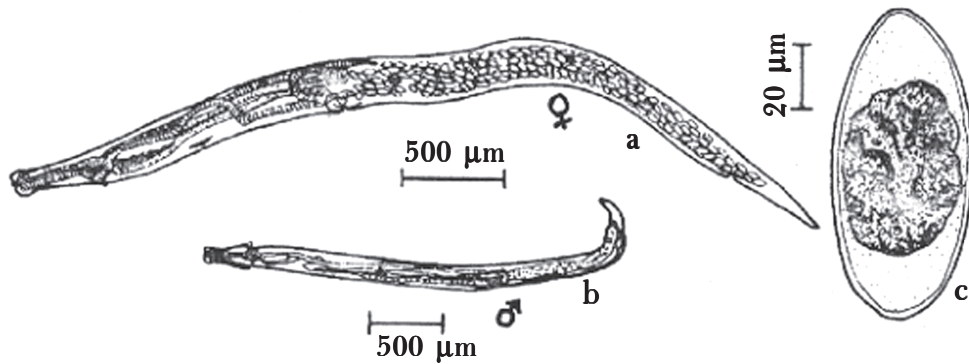



Figura 1.3

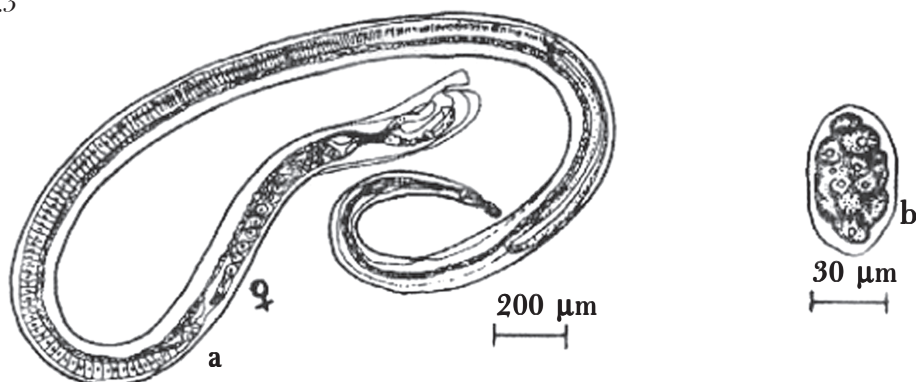



Figura 1.4

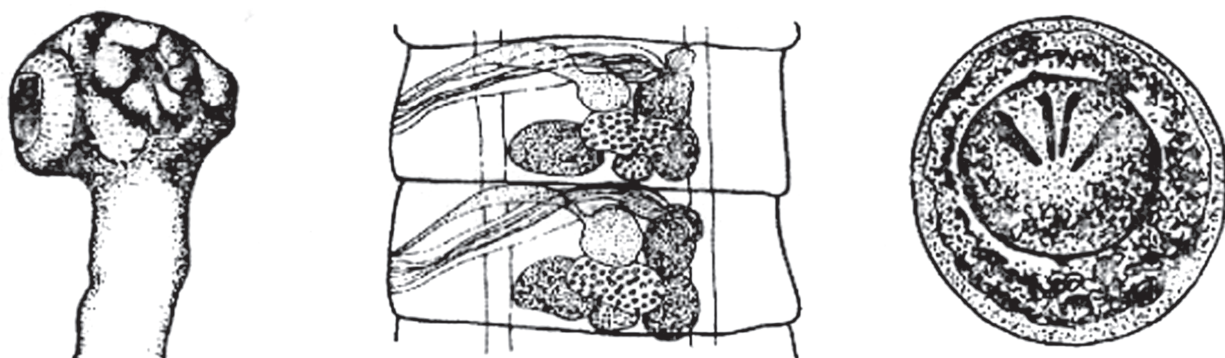



Figura 1.5

Figura 1.6

Figura 1.7

Figura 1.8

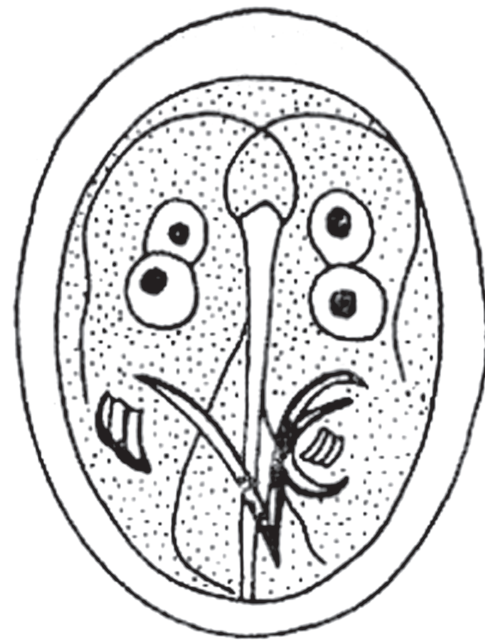



Figura 1.9

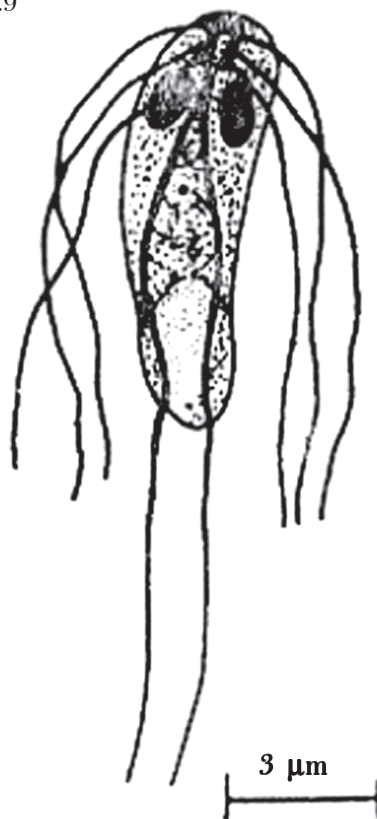



Figura 2.0

Figura 2.1
Figura 2.2
25 µm
25 µm
Figura 2.3
a
b
c
d
10 µm
10 µm
20 µm

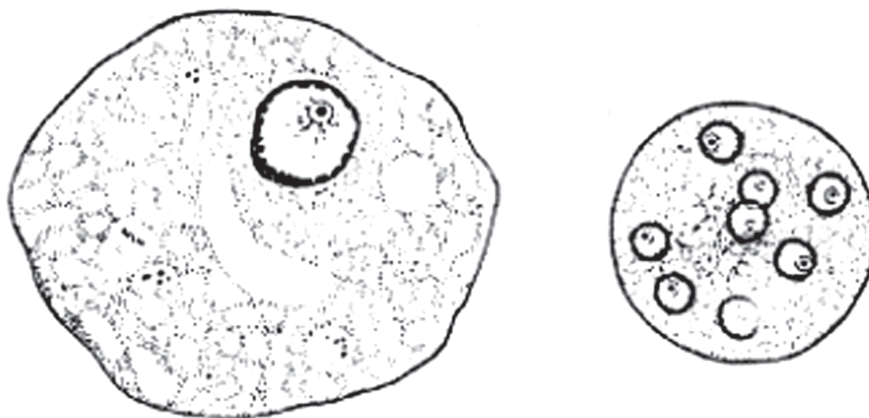
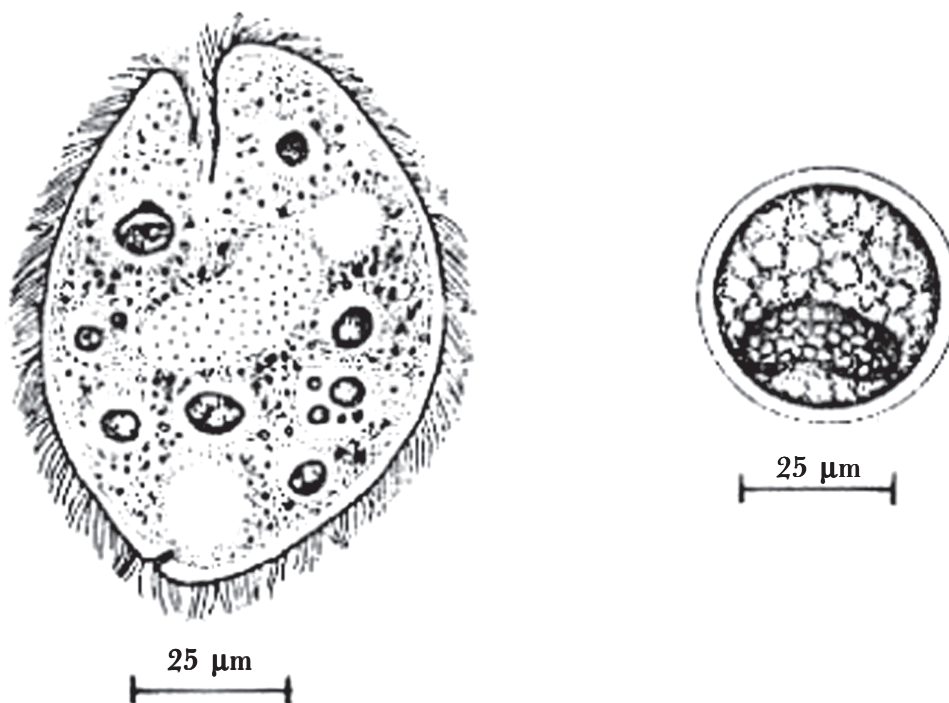
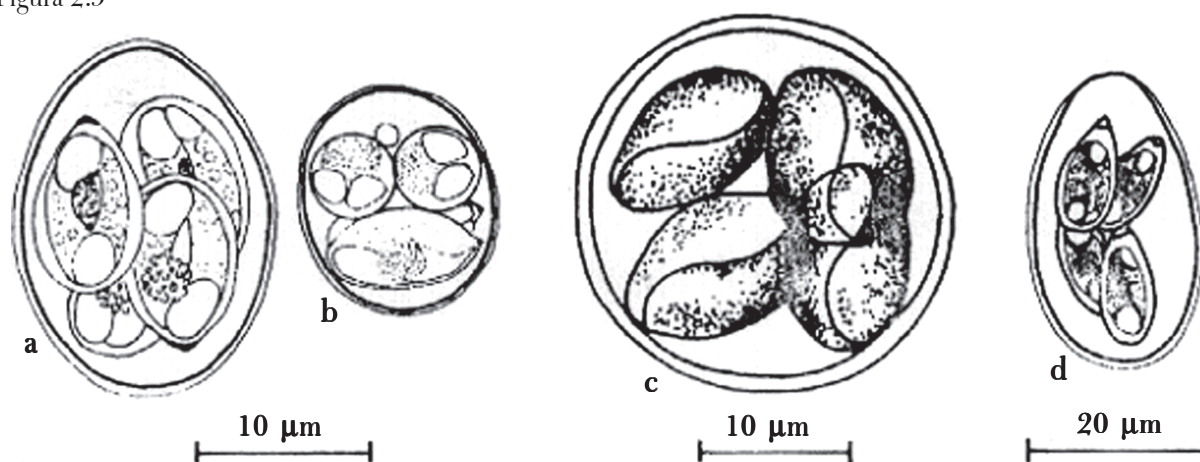



Figura 2.4
1000 µm
Figura 2.5
1000 µm
Figura 2.6
1000 µm
Figura 2.7
1000 µm

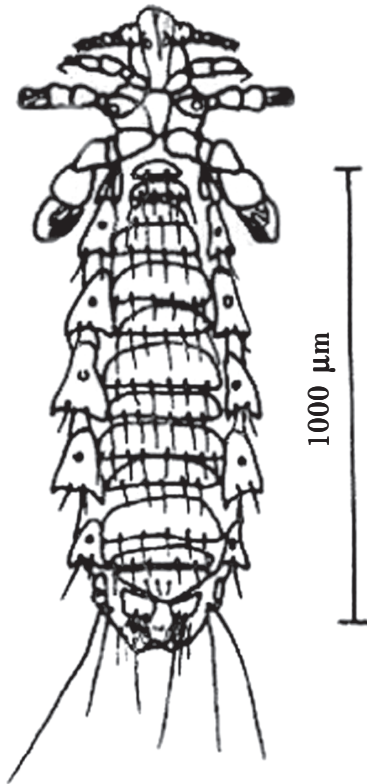
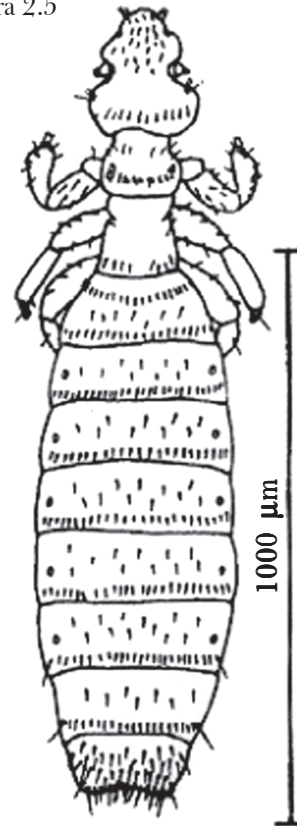
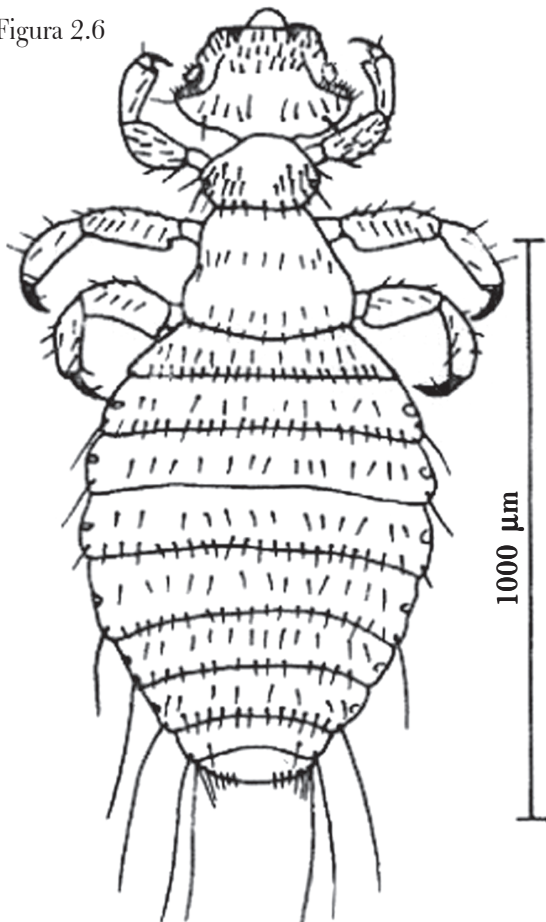



Figura 2.8
100 µm
Figura 2.9
100 µm
Figura 3.0
100 µm
Figura 3.1
200 µm

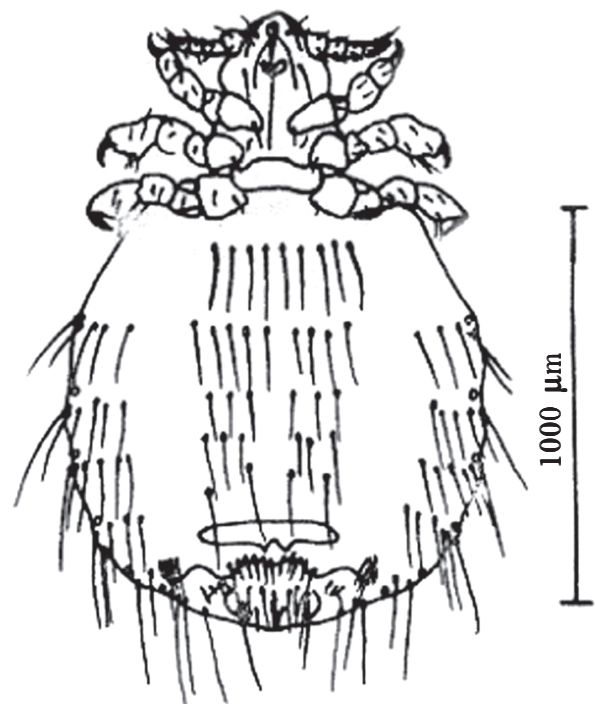
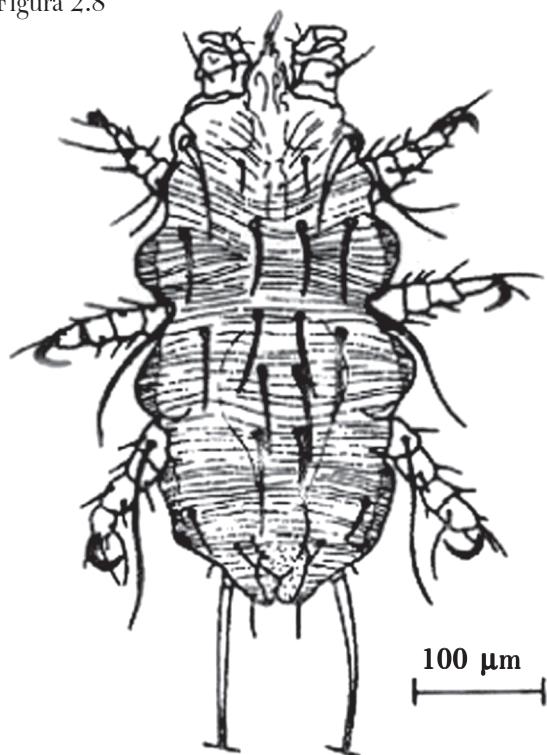
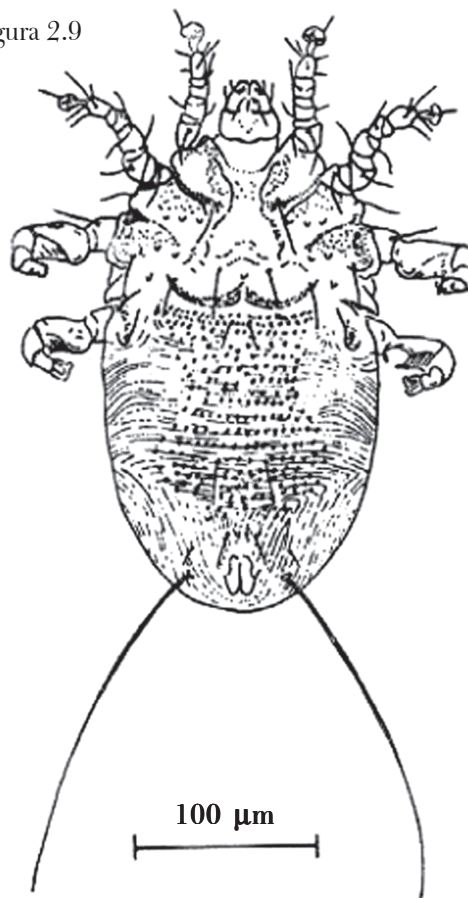
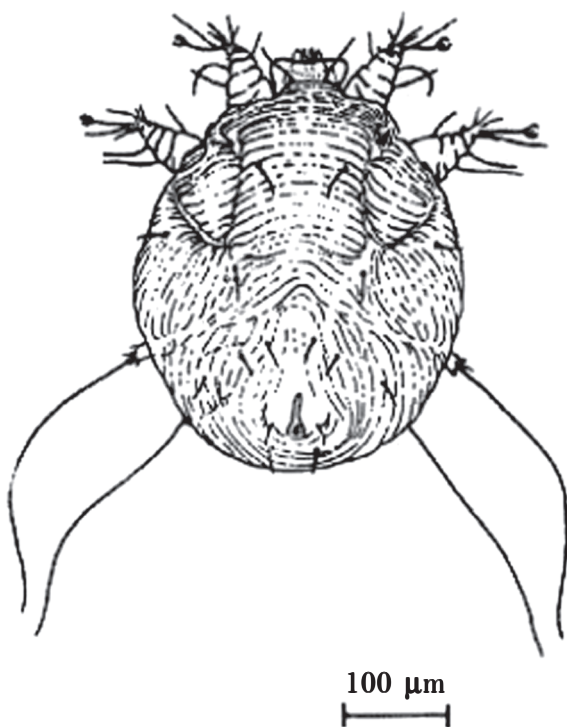
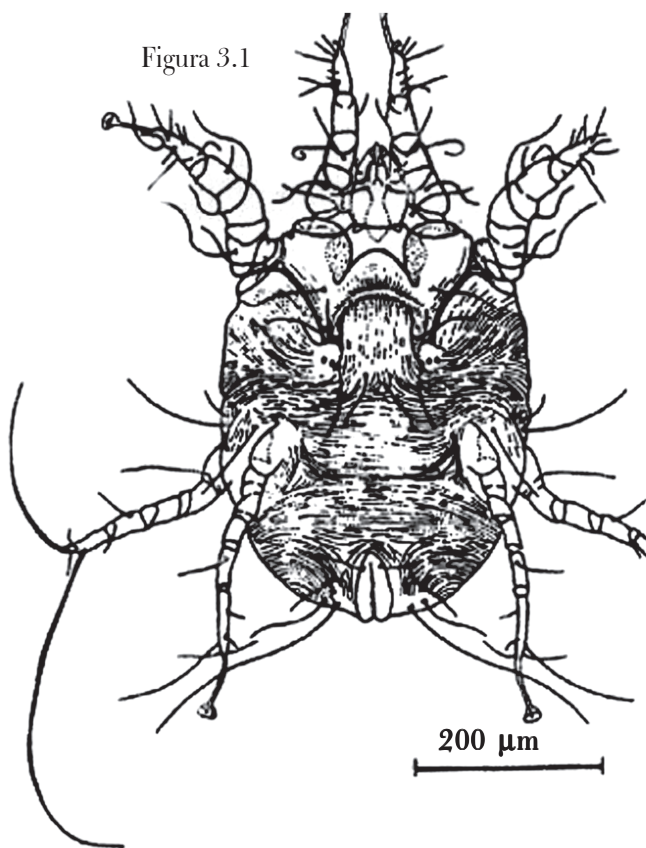
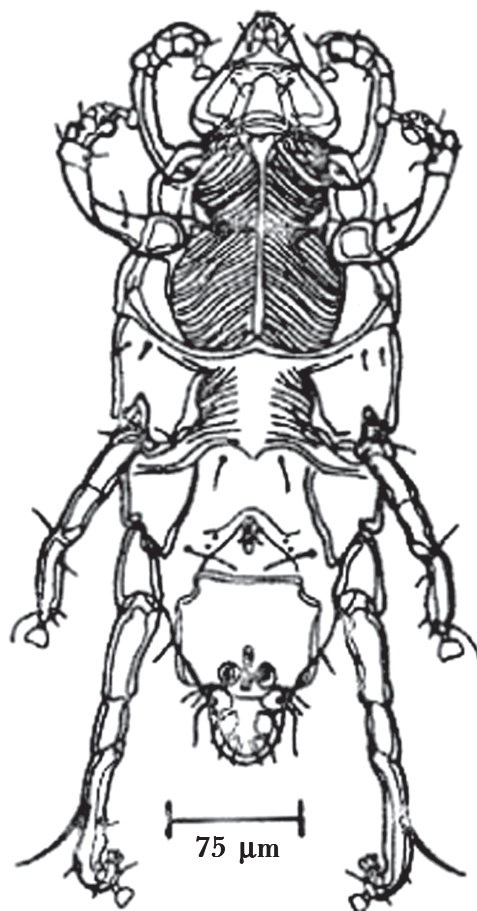



Figura 3.2

Fonte: *Manual para Técnicos em Bioterismo* (1996).

Bibliografia

Borchet, A. *Parasitologia Veterinária*. Espanha: Acribia, 1975.

De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Flynn, R. J. *Parasites of Laboratory Animals*. Iwoa: Iwoa State University Press, 1973.

Smith, A. W. *El Raton*. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Febre Aftosa, 1976.

Menendez, R. C. *Animales de Labortório en las Investigaciones Biomedicas*. Cuba: Ciências Médicas, 1985.

National Research Council. *Companion Guide to Infectious Diseases of Mice and Rats*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1991.

Jalmes, C. A. C. et al. *Control de Calidad de Animales de Laboratorio.* Caracas: INHRR, 1997.

36

Controle Sorológico de Viroses Murinas

Marcos Antônio Pereira Marques

Introdução

A detecção de vírus nas colônias de animais de laboratório é importante não só para o biotério que mantém colônias de criação de camundongos e ratos, mas para o pesquisador que utiliza o animal como reativo biológico ou derivado orgânico para produção e controle de imunobiológicos. Devido à resistência inata ou adquirida, a maioria dos animais contaminados não apresenta sinais evidentes de doença, podendo esta passar despercebida pelos técnicos que manipulam os animais dentro dos biotérios e nos laboratórios, ocasionando alterações de resultados experimentais, erros de interpretação dos mesmos, alterações dos parâmetros fisiológicos, contaminação de materiais biológicos como soros, vacinas e anticorpos monoclonais, e interferindo nos estudos, isolamentos e ação de outros microorganismos de interesse da pesquisa.

Entretanto, quando camundongos naturalmente infectados são imunossuprimidos quimicamente por inoculação, irradiação, ou submetidos ao estresse, por longos períodos, podem ocorrer manifestações clínicas características da infecção natural.

Hoje em dia, os grandes centros de pesquisas utilizam animais de laboratório sanitariamente definidos e livres de microorganismos específicos à pesquisa a ser realizada, bem como na produção e no controle de imunobiológicos. Em razão do grande avanço biotecnológico, a utilização de animais com padrões sanitários definidos atende aos requisitos das pesquisas biomédicas, tendo como objetivo a aquisição de resultados experimentais precisos e a utilização de quantidade mínima de animais.

Periodicidade do Controle Sorológico

Controle sorológico é a realização de testes repetitivos padronizados e previamente programados para detectar a presença de anticorpos ou de agentes infecciosos no soro de animais de laboratório.

O controle sorológico deve levar em consideração o padrão sanitário da colônia e o objetivo do experimento ao qual os animais serão submetidos. A questão das viroses específicas deve ser levada em consideração, e nas espécies que possuem mais de uma linhagem cada uma deverá ser analisada periodicamente.

A freqüência na realização de exames sorológicos em colônias de camundongos e ratos deverá ser realizada com intervalos de três meses nas colônias de fundação e de expansão de matrizes, já nas colônias de produção o período de intervalo poderá chegar a seis meses.

Nos biotérios de animais SPF (*Specific Pathogen Free*), gnotobióticos e axênicos, onde as salas de criação são independentes, o intervalo entre as monitorizações microbiológicas não deve ser muito grande, tendo em vista que quanto mais cedo for detectada uma possível contaminação numa sala, maiores serão as chances de isolá-la e de evitar a disseminação do agente infeccioso para as outras.

O padrão sanitário da colônia é resultado direto das práticas de manejo de uma colônia. Nas colônias convencionais sem barreiras sanitárias, a monitorização deve ter como objetivo os microorganismos de interesse do usuário, ou é limitada a microorganismos altamente patogênicos para espécie animal, e obrigatoriamente os zoonóticos. Quando os animais apresentam sinais clínicos de doença ou achados de necropsia, é necessário fazer exames específicos, visando à identificação dos agentes com maior probabilidade de causar alterações clínicas e lesões observadas; esses exames devem ser realizados o mais rápido possível nos animais doentes, utilizando todos os métodos necessários ao diagnóstico da enfermidade, independentes dos testes realizados no controle sorológico.

Escolha da Amostra para o Controle Sorológico

A amostra utilizada para detectar a presença de um agente infeccioso depende do grau de infecção da população animal e do limite de confiança desejado.

O grau de infecção é influenciado por diversos fatores: linhagem, idade do animal, densidade populacional e a patogenicidade do microorganismo.

Os animais devem ser escolhidos de forma aleatória de cada sala de criação. Os testes sorológicos para detecção de anticorpos devem ser realizados em animais adultos imunocompetentes com mais de doze semanas (adultos jovens) e animais com mais de vinte semanas (adultos velhos) que tenham estado na colônia o tempo suficiente para manter contato com os agentes infecciosos e desenvolver anticorpos. Todos os animais retirados das colônias de fundação e expansão de matrizes devem ser examinados.

A fórmula abaixo permite calcular o tamanho da amostra numa determinada população:

$$A = \frac{\log a}{\log (1-N)}$$

Onde: A é o número de animais a serem examinados; a é o limite de confiança desejado, e N é o grau de infecção na colônia (porcentagem de animais doentes).

Tabela 1 - Tamanho mínimo da amostra para detecção de uma infecção numa colônia

GRAU DE INFECÇÃO (0%)	LIMITE DE CONFIANÇA	
	99% (a=0,01)	95% (a=0,05)
	nº de animais	nº de animais
0,1 (10)	44	29
0,2 (20)	21	14
0,3 (30)	13	9
0,4 (40)	9	6
0,5 (50)	7	5
0,6 (60)	5	4
0,7 (70)	4	3
0,8 (80)	3	2
0,9 (90)	2	2

Fonte: Institute of Laboratory Animal Ressources (Ilar) (1976); Hsu, New & Mayo (1980); Small (1984).

Diagnóstico Laboratorial das Viroses Murinas

Tendo em vista que as infecções virais nas colônias de roedores são, em sua maioria, enzoóticas e subclínicas, deve-se escolher métodos de diagnósticos com alto índice da especificidade e sensibilidade que possam assegurar a presença desses agentes na colônia.

O exame laboratorial de uma virose serve, não só para confirmar uma dada infecção, ou uma suspeita clínica, mas também para identificar o tipo de agente causal na diferenciação de um quadro clínico de outro e durante surtos epidêmicos para que se adotem as precauções profiláticas ou vacinais necessárias.

Por isso, o diagnóstico é hoje dividido em: clássico e rápido.

Diagnóstico Clássico das Viroses

O diagnóstico laboratorial clássico de uma virose compreende duas etapas:

- isolamento e identificação de vírus;
- inoculação em animais de laboratório para reprodução dos aspectos clínicos.

O simples isolamento de um vírus, a partir de material clínico, não significa, necessariamente, que aquele vírus seja o agente causal da infecção.

Diagnóstico Rápido das Viroses

O diagnóstico rápido das viroses nasce da necessidade de se ter um resultado imediato que reconheça o agente viral causal. Alguns vírus podem ser detectados no núcleo ou no citoplasma das células dos órgãos-alvo, fezes, urinas, secreções e líquidos biológicos. A coleta e a conservação desses materiais biológicos é de extrema importância para o diagnóstico laboratorial.

Para o diagnóstico rápido, tem-se utilizado o microscópio eletrônico, na observação morfológica do vírus, podendo também ser utilizada a imunoeletromicroscopia, utilizando-se soros padrões. Hoje em dia, uma série de testes imunológicos é utilizada para detectar proteínas virais diretamente de secreções orgânicas, tais como imunohistoquímica, imunoperoxidase e imunofluorescência direta.

O diagnóstico sorológico baseia-se na pesquisa de anticorpos sérios formados pela estimulação do sistema imunológico dos animais que entraram em contato com o vírus. Entre as técnicas mais utilizadas, encontramos a reação de Elisa (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que é muito sensível e tem boa especificidade, permitindo realizar a pesquisa de grandes quantidades de amostras sorológicas em um período de tempo relativamente curto. A reação de imunofluorescência evidencia a reação antígeno-anticorpo através de um fluorocromo ligado ao anticorpo; apresenta alta especificidade e sensibilidade, sendo muito utilizada para sorodiagnóstico virológico. A reação de imunofluorescência pode ser:

- método indireto – utilizado para detectar o anticorpo vírus-específico, servindo também para classificar o antígeno viral por meio de um anti-soro específico. Realizado em duas etapas.
- método direto – utilizado para identificar o antígeno viral através dos anticorpos específicos marcados, sendo realizado numa única etapa.

A Reação de Inibição da Hemaglutinação (IHA) é utilizada para vírus que possuem hemaglutininas, proteínas virais com capacidade de aglutinar hemácias. Em condições especiais, a hemaglutinação pode ser inibida por anticorpos específicos contra o vírus.

Na reação de imunodifusão, o antígeno e o anticorpo difundem-se em meio sólido, formando linhas de precipitação na zona de equivalência (proporções ideais de Ag e Ac); esta reação é usada para caracterizar antígenos virais por soros específicos conhecidos.

Medidas Profiláticas nas Colônias de Criação

Os animais de laboratório mantidos em colônia de criação em biotérios convencionais podem ser contaminados de várias formas: objetos contaminados que entram na sala de criação (gaiolas, tampas, maravalha etc.); mediante vetores biológicos, tais como insetos, roedores silvestres, ou mesmo pela introdução de animais provenientes de outra sala de criação.

Porém, nos biotérios com barreiras de proteção, a contaminação dos animais se dá por falhas técnicas que levam à quebra das barreiras de proteção, por veiculação ou desatenção do bioterista.

As medidas profiláticas adotadas em biotérios com barreiras sanitárias devem incluir:

· técnicas de manejo adequadas para a espécie em criação, de acordo com os padrões sanitários da colônia (convencional/SPF etc.);
· rotina periódica de desinfecção do ambiente;
· programa de controle microbiológico permanente, diagnósticos rápidos e precisos;
· capacitação de recursos humanos com orientação sanitária.

Partindo-se do princípio de que os vírus são altamente contagiosos, e muito prevalentes nas colônias sem barreiras sanitárias (convencionais), uma vez diagnosticados na colônia, dificilmente se conseguirá eliminá-los.

A exterminação da colônia e a descontaminação do ambiente, com a posterior introdução de animais limpos, a implantação de sistemas de barreiras sanitárias, têm sido a conduta mais eficiente na erradicação de agentes infecciosos. Porém, quando a eliminação da colônia for impossível, as técnicas de histerectomia e transferência de embriões são os procedimentos recomendados.

Principais Vírus Murinos

Vírus da Hepatite Murina (MHV)

É um vírus RNA pertencente à família Coronaviridae, enquadrando-se no gênero *Coronavirus*; possui a estrutura do capsídeo com forma helicoidal e presença de envelope. O diâmetro do vírus mede 80nm-130 nm. É sensível ao éter e ao clorofórmio, termolábil, e produz antígeno fixador do complemento. Desde de 1949, cerca de 12 vírus diferentes têm sido descritos e colocados no grupo do MHV. Apesar de que esses vírus variam em sua patogenicidade e em seu tropismo tecidual, todas as cepas têm em comum a fixação do complemento. A cepa MHV-1 é relativamente avirulenta. Todas as cepas produzem hepatite, porém a cepa MHV-4 é mais encefalogênica, ao passo que a cepa MHV-3 produz ascite.

transmissão: a transmissão se faz pela via oral-fecal. A infecção natural produz títulos baixos de anticorpos. O vírus é excretado pelas fezes, sendo raramente encontrado no fígado. A baixa imunidade e a localização do vírus explica porque o MHV produz infecções inaparentes que podem ser ativadas sob certas condições. A resistência à enfermidade aumenta com a idade, sendo somente os vírus mais virulentos responsáveis por graves quadros clínicos e morte do animal.

Experimentalmente, o vírus MHV pode ser transmitido facilmente por via intraperitoneal, oral, subcutânea e por exposição a aerossol. Ocasionalmente, o MHV aparece como um contaminante de material, que se está utilizando em passagens seriadas, como ocorre com o tumor ascítico. As fezes infectadas são as principais fontes de contaminação, com vias de entrada tanto oral como respiratória. Aparentemente não ocorre transmissão placentária.

controle: a rederivação cesariana oferece o método mais seguro para eliminar o MHV de uma colônia. Devido a sua natureza altamente contagiosa e sua prevalência nas colônias de camundongos, são necessárias

barreiras de proteção e medidas de proteção no manejo, bem como na higienização dos materiais que entram na colônia.

Vírus da Pneumonia Murina (PVM)

Este vírus foi descoberto em 1939 em experiências destinadas a isolar vírus respiratórios humanos. O material foi obtido de pulmões de camundongos e ratos em passagens seriadas por via intranasal. Em camundongos aparentemente sadios produzia uma enfermidade pulmonar. O vírus da pneumonia murina é um paramixovirus, com RNA de fita simples, termolábil, sensível ao éter, e apresenta afinidade pelo tecido pulmonar de uma variedade de espécies mamíferas.

TRANSMISSÃO: o PVM é um vírus estritamente pneumotrópico, não se disseminando facilmente por contato direto, e só é transmitido experimentalmente por instilação nasal de homogenato pulmonar. O vírus não atravessa a placenta, não sobrevive na presença de anticorpos (neutralizantes) em camundongos jovens; entretanto, ocasiona uma infecção aguda, assintomática e enzóotica. As infecções agudas que se observam como enzootinas focais são testemunho da escassa contagiosidade do vírus. O vírus tem sido isolado de camundongos, ratos e *hamsters*, sendo achados anticorpos neutralizantes em outras espécies de mamíferos, inclusive no homem.

A enfermidade clínica raramente é aparente, porém em necropsia podemos encontrar pulmões difusamente congestionados de coloração vermelha escura. Microscopicamente, observa-se edema pulmonar e focos de pneumonia intersticial com infiltração de mononucleares. O diagnóstico de laboratório se baseia na demonstração da presença de anticorpos de inibição da hemaglutinação (HI), anticorpos fixadores do complemento (FC) e passagens seriadas em camundongos de 7 a 9 dias, com o aparecimento de sinais típicos da infecção e o isolamento do vírus (células BHK-21).

CONTROLE: a presença da enfermidade pode ser demonstrada sorologicamente e em razão da incapacidade do vírus de atravessar a barreira placentária; a derivação cesariana mantém a colônia livre de PVM e, quando combinada com exames sorológicos periódicos, constitui um método prático e efetivo para eliminar a pneumonia viral do camundongo.

Vírus da Encefalomielite Murina de Theiler (TMEV/GDVII)

Em 1933, Max Theiler preparou uma suspensão de cérebro e medula espinhal de camundongo albino jovem que havia apresentado paralisia flácida das patas traseiras. A preparação foi inoculada por via intracerebral em outros camundongos que desenvolveram a enfermidade paralítica similar. Posteriormente, a enfermidade recebeu considerável atenção devido a sua semelhança com a poliomielite humana. Esta infecção predominantemente latente pode ser desencadeada como uma enfermidade clínica por meio de estresse experimental, podendo, por conseguinte, interferir ativamente com interpretações de resultados.

O vírus é classificado como picornavírus de 15nm a 30 nm de diâmetro; possui RNA de cadeia simples; é termolábil, sem envelope e resistente ao éter.

TRANSMISSÃO: a infecção se dá através do contato com as fezes da mãe, porém são protegidos dos efeitos da infecção devido à presença de anticorpos maternos, passados por intermédio da lactação. Os camundongos jovens geralmente são positivos para anticorpos anti-GDVII, pouco após amamentar. Em camundongos com anticorpos positivos, a infecção persiste por longos períodos com eliminação de vírus pelas fezes. Clinicamente, o único sintoma de infecção natural é uma paralisia flácida dos membros posteriores que pode ser progressiva. Pode-se observar, também, pêlos eriçados, *circling* e *rolling*, particularmente nas cepas com tropismos mais encefalogênicas, como a GDVII e Fa.

controle: existem evidências de que a derivação cesariana proporciona um método adequado para limpar a colônia infectada por TMEV.

Vírus da Ectromélia

O vírus da Ectromélia pertence à família Poxviridae, gênero *Orthopoxivirus*, e apresenta simetria complexa, medindo 175 x 290 nm, sendo morfologicamente indistinguível do vacínia vírus e são os únicos vírus com DNA de fita dupla que replicam no citoplasma da célula. Apresentam envelope, sendo sensíveis aos solventes de lipídios.

Por seu avanço insidioso e devastador em colônias suscetíveis, a ectromélia é considerada como uma das mais importantes viroses do camundongo. Pouco se sabe de tais ocorrências, porém pode-se presumir que a ectromélia, quando transmitida como vírus latente, é capaz de alterar resultados experimentais.

transmissão: a enfermidade pode existir em três formas: aguda, crônica e latente. A forma aguda é rapidamente letal, podendo matar mais de 90% da colônia. A forma crônica se desenvolve com lesões típicas na epiderme do camundongo. A forma latente pode ser totalmente inaparente, no entanto, os camundongos podem transmitir a enfermidade sem apresentar títulos de anticorpos.

As vias de infecções podem ser por escoriações na pele, inalação ou por ingestão. A ingestão pode ser considerada como a mais importante nas infecções latentes, nas quais os anticorpos maternos passam para os filhotes juntamente com os vírus ingeridos durante a lactação. Os filhotes sobrevivem, porém ficam infectados e posteriormente atuam como disseminadores de vírus.

O genótipo do camundongo infectado pode influenciar profundamente a natureza e a disseminação da ectromélia numa colônia de camundongos. Por exemplo, as linhagens DBA/1 e C3H são extremamente suscetíveis à infecção e apresentam alto índice de mortalidade (85%), e as linhagens BALB/c, C57BL/6 e AKR são resistentes, apresentando um índice de letalidade de 1%. No caso do C57BL/6, sua resistência é de natureza genética e se deve a uma rápida e eficiente resposta imunológica pós-infecção. Assim sendo, os camundongos C57BL/6 e outras linhagens de camundongos resistentes podem ser portadores assintomáticos, parcialmente imunes a enfermidade, servindo como fonte de infecção para camundongos suscetíveis.

O vírus eliminado pelas fezes e pelas escoriações epidérmicas é muito estável, podendo permanecer infeccioso por várias semanas no ambiente.

A patogenia consecutiva à infecção viral segue o seguinte trajeto: a enfermidade se incuba por sete dias, e nesse período o vírus se multiplica no local da entrada, disseminando para os linfonodos regionais, seguindo-se de uma multiplicação viral no fígado e no baço e, finalmente, ocorrem infecções focais na pele, com o aparecimento de lesões cutâneas.

controle: o controle dos focos pode ser feito por sacrifício dos camundongos da colônia. A derivação cesariana pode ser utilizada, visto que esta virose não se transmite verticalmente.

Rotavírus (Edim)

O rotavírus é um vírus RNA fita dupla, pertencente à família Reoviridae, gênero *Rotavirus*, grupo A, possui de 65nm a 80nm, apresentando simetria esférica, resistente ao éter, com a especificidade pelo citoplasma das células do epitélio intestinal.

A diarréia epizoótica do recém-nascido é uma infecção transmitida pelo ar e, quando endêmica na colônia, ataca principalmente as fêmeas primíparas. O período de incubação depende da dose infectante e da idade do camundongo. Todos os camundongos de três dias de idade infectados experimentalmente por via oral mostram sintomas no período de uma semana; entretanto, os camundongos de duas semanas de idade dificilmente

manifestam enfermidade clínica. As fêmeas multíparas desenvolvem anticorpos neutralizantes quando expostas ao vírus e infectam sua primeira ninhada; no entanto, oferecem considerável proteção passiva às ninhadas seguintes.

> TRANSMISSÃO: em camundongos infectados com menos de duas semanas de idade, desenvolve-se uma viremia que persiste por dois dias. O vírus pode ser achado em vários órgãos, alcançando títulos elevados no intestino e no conteúdo intestinal. As fêmeas infectadas, quando adultas, apresentam viremia e vírus no intestino, e os machos adultos só apresentam infecção intestinal.

O vírus é eliminado continuamente do intestino durante 17 dias depois da infecção, porém alguns camundongos podem apresentar anticorpos neutralizantes e continuar eliminado vírus pelas fezes.

Clinicamente, a enfermidade afeta camundongos lactentes de 7 a 17 dias de idade e não se tem visto em camundongos com mais de 21 dias. O exame macroscópico dos lactentes infectados mostra fezes líquidas, de cor amarela, com presença de gases. O exame microscópico revela lesões no intestino delgado que consistem no desprendimento das células das microvilosidades. A inflamação não é uma característica sempre presente nessas lesões. Os camundongos adultos infectados não apresentam lesões, ainda que estejam disseminando vírus.

O diagnóstico de laboratório pode basear-se no isolamento do vírus e na produção de enfermidade típica em camundongos jovens. Os anticorpos fixadores de complemento, específicos para a diarréia epizoótica (Edim), podem ser detectados no soro hiperimune, porém ausentes no soro convalescente. No entanto, a reação de imunofluorescência é específica e muito sensível, demonstrando a presença de antígeno no citoplasma das células epiteliais entéricas tanto de infecções naturais como experimentais. A diferenciação entre o vírus da diarréia epizoótica e o vírus intestinal letal dos camundongos jovens deve ser levada em consideração, não só pelo curso da infecção, mas também pelo diagnóstico e as medidas profiláticas adotadas na colônia.

> CONTROLE: algumas colônias de camundongos portadoras dessa enfermidade têm sido tratadas com antibióticos, com alguns resultados positivos, porém esta não é uma medida satisfatória. O controle eficaz é feito através da derivação cesariana. A utilização de gaiolas com filho na tampa constitui outro meio eficaz de controlar a enfermidade e prevenir sua disseminação.

Referências Bibliográficas

INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES (ILAR). Long-term holding of laboratory rodents: a report of the Committee on long-term holding of laboratory rodents. *Ilar News*, 19:L1:L25, 1976.

HSU, C. K.; NEW, A. E. & MAYO, J. G. Quality assurance of rodents models. In: SPIEGEL, A.; ERICHSEN, S. & SLLEVELD, H. A. (Eds.). *Animal Quality and Models in Biomedical Ressarch*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1980.

SMALL, J. D. Rodent and lagomorph health surveillance-quality assurance. In: FOX, J. G.; COHEN, B. J. & LOEW, F. M. (Eds.) *Laboratory Animal Medicine*. New York: Academic Press, 1984.

Bibliografia

CHARLES RIVER LABORATORIES. *Serologic Testinj of Rodentes for Viral Infections: interpretation of results*. Washington, D.C.: Academy Press, 1991.

DE LUCA, R. R. et al. *Manual para Técnicos em Bioterismo*. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Foster, H. L.; Small, J. D. & Fox, J. G. *The Mouse In Biomedical Research Disease*. New York: Academic Press, 1982. v.2.

National Research Council. *Companion Guide to Infectious Diseases of Mice and Rats*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1991.

Controle Bacteriológico, Micológico e Micoplasma: animal e ambiental

Alexandre de Oliveira Saisse

Introdução

Saúde é o resultado do equilíbrio entre um ser vivo, seu meio ambiente e os diversos agentes que possam produzir doenças. O estado de saúde de um ser vivo envolve as condições de bem-estar físico, mental ou psicológico e social.

Microbiota Normal

É importante saber, na microbiologia clínica, que os animais possuem espécies de microorganismos comuns em sua microbiota. Por isso há necessidade de um perfeito conhecimento direcionado para o modelo animal a ser trabalhado.

O Estado de Saúde

A exteriorização do estado de saúde se dá pelo comportamento dos indivíduos de uma colônia quando se encontram isolados ou em grupos.

Conhecer as características de comportamento das diferentes espécies utilizadas em trabalhos experimentais é de grande importância para as avaliações diárias das colônias de animais. Em geral, esses animais apresentam um comportamento social bem-definido, ajudando no estabelecimento de normas para o reconhecimento de animais-problema.

Os métodos clínicos usuais para avaliar as condições de saúde de um animal ou de grupos de animais em biotério se resumem em inspeção, palpação e auscultação. Nas rotinas diárias, a inspeção é o método mais utilizado, oferecendo dados importantes na orientação de métodos de trabalho.

A atuação dos técnicos, com os grupos de animais, constitui um dos principais fatores para o sucesso de um exame laboratorial, pois ele se encarregará de visualizar, avaliar e encaminhar ao laboratório de controle todos os animais que apresentem alguma anormalidade, fazendo constar os dados do animal (idade, sexo, comportamento etc.).

Alguns fatores que podem interferir na saúde dos animais de laboratório:

- Alojamento – densidade populacional, tipo de gaiola e freqüência de troca (gaiolas ou caixas). O elevado número de habitantes, a propagação de ectoparasitos e endoparasitos, bem como a disseminação de doenças respiratórias e de pele (fungos, abscessos etc.) tende a se elevar, principalmente pelo aumento da umidade e temperatura microambiente.

- operador – é um dos principais carreadores de contaminação para uma área de criação, por isso há necessidade de uma perfeita conscientização quanto às normas de higienização inerentes a sua área de atuação.
- ambiente – deverá ser desinfectado freqüentemente com soluções que tenham poder bactericida, fungicida e esporocida comprovados.
- trânsito de pessoal – deve ser restrito aos técnicos que trabalham nas dependências da área de criação para evitar contaminações externas.
- ração – constitui um potencial veículo de contaminação para os animais, pois pode conter bactérias e fungos. A carência de vitaminas e de sais minerais, essenciais à dieta alimentar, propicia o aparecimento de doenças.

Devemos observar sua qualidade e o prazo de validade, bem como realizar exames periódicos (análise centesimal e microbiológica).

- água – como a ração, necessita ser trocada constantemente, pois no ato de o animal beber ocorre uma lavagem da parte bucal (refluxo) que volta ao frasco, contaminando assim a água existente no bebedouro e podendo causar sérios problemas.
- animais – a prática da quarentena e a realização dos exames (bactérias, fungos, vírus, micoplasma, ecto e endoparasitos) são indispensáveis para garantir o seu *status* sanitário.

Cada espécie animal criada em sala própria, com tratadores específicos, evita a disseminação de microorganismos, por vezes presentes em várias espécies.

Características Sanitárias dos Animais de Laboratório

Pele e Pêlos

- condições normais – pêlos homogêneos, brilhantes e sedosos com inserção firme; pele elástica, hidratada (úmida), cor rósea, ou característica da espécie ou linhagem.
- alterações – deficiência alimentar, desidratação, anemias, alergias, infecções, tumores, abscessos e ectoparasitoses.

Dependendo da espécie, podemos encontrar como microorganismos causadores dessas afecções: *Straphylococcus aureus, Dermatophytes* (fungos) e *Pasteurella pneumotropia*.

Mucosas

- condições normais – úmidas, brilhantes e róseas.
- alterações – desidratação, anemias, deficiência nutricional, verminoses, infecções, hemorragia e tumores.

Dependendo da espécie, podemos encontrar como microorganismos causadores dessas afecções: bactérias e fungos.

Olhos

- condições normais – brilhantes, úmidos e vivazes.
- alterações – inflamações, enfiações, carência nutricional, alergias e irritação.

De acordo com a espécie, podemos encontrar, como causadores dessas afecções, os seguintes microorganismos: *Pasteurella pneumotropica, Salmonela enteritidis, Staphylococcus aureus* e *Streptococcus moniliformis.*

Aparelho Auditivo

- condições normais – sensíveis a estímulos sonoros de intensidade variável conforme a espécie.
- alterações – inflamações, infecções, distúrbios neurológicos ou circulatórios.

De acordo com a espécie, podemos encontrar como microorganismos causadores dessas afecções:

- ✓ Otites interna: *Mycoplasma pulmonis, Pseudomonas aeruginosa* e *Streptobacillus moniliformis.*
- ✓ Otites média: cilia – associado a *Bacillus* respiratório –, *Mycoplasma pulmonis, Pasteurella pneumotropica, Pseudomonas aeroginosa, Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes.*

Aparelho Digestivo

- condições normais – boca e dentição normais, lábios íntegros e úmidos, mucosa bucal e gengiva úmidas e coloração compatível com a espécie, esôfago, estômago, intestino, fígado e pâncreas sem alterações.
- alterações – disfunções hormonais, avitaminoses, estresse, densidade populacional, infecções e tumores são alguns fatores que podem provocar distúrbios do trato digestivo, causando lesões na cavidade bucal, presença de diarréia ressecamento de mucosas e edemas.

De acordo com a espécie, podemos encontrar como microorganismos causadores dessas afecções: *Corynebacterium kutscheri, klebsiella pneumoniae, Mycoplasma pulmonis, Estreptobacillus piliformis* e *Staphylococcus aureus*.

Existe uma grande variedade de microorganismos patogênicos causadores de patologias no trato digestivo.

De acordo com a espécie, podemos encontrar como microorganismos causadores dessas afecções:

- Laringe, faringe e traquéia:
  - ✓ *Mycolplasma pulmonis*
  - ✓ *Staphylococcus* spp
  - ✓ *Streptococcus pneumoniae*
  - ✓ *Corynebacterium kutscheri*
  - ✓ *Escherichia coli*
  - ✓ *Proteus* spp

- Fígado:
  - ✓ *Bacillus piliformis*
  - ✓ *Corynebacterium kutscheri*
  - ✓ *Klebsiella pneumoniae*
  - ✓ *Salmonella* spp
  - ✓ *Streptococcus monilifomis*

- Intestino:
  - ✓ *Bacillus piliformis*
  - ✓ *Salmonella* spp
  - ✓ *Escherichia coli*

Aparelho Geniturinário

- condições normais – Fêmeas: aspecto morfológico das glândulas mamárias normais, vagina úmida com características próprias, sem presença de corrimento. Machos: com aspecto característico sem presença de corrimento no trato urinário.

- ALTERAÇÕES – disfunções hormonais, avitaminoses, estresse, densidade populacional, infecções e tumores são alguns fatores que podem provocar alterações do trato geniturinário.

De acordo com a espécie, podemos encontrar como causadores dessas afecções, os seguintes microorganismos: *Corynebcterium kutscheri, Klebisiella pneumoniae, Mycoplasma pulmonis, Estreptobacillus piliformis* e *Staphylococcus aureus*.

Aparelho Respiratório

- CONDIÇÕES NORMAIS – freqüência característica da espécie, ausência de ruídos anormais (ronqueira ou chiado), espirros, tosse e corrimento nasal.
- ALTERAÇÕES – irritação causada por poeira ou gases, infecções, pneumonia, bronquites, verminoses, alteração na capacidade respiratória, espirros, tosse e presença de corrimento nasal.

De acordo com a espécie, podemos encontrar como microorganismos causadores dessas afecções: *Cilia* – associado a *Bacillus* respiratório –, *Corynebacterium kutscheri, Mycolplasma pulmonis, Streptococcus pneumoniae, Bordetella* sp e *Pasteurella* sp.

Aparelho Circulatório

- CONDIÇÕES NORMAIS – freqüência característica da espécie, coloração normal de mucosas, ausência de edemas, sobretudo nas extremidades.
- ALTERAÇÕES – desidratação, hemorragia, verminoses, malformação, infecções por vezes generalizadas, dificuldades de respiração, alteração da freqüência respiratória e edemas.

De acordo com a espécie, podemos encontrar como microorganismos causadores dessas afecções: *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus* spp, *Klebsiella pneumoniae, Mycoplasma pulmonis* e *Bacillus piliformis*.

Sistema Nervoso

- CONDIÇÕES NORMAIS – cérebro, cerebelo, medula, gânglios e nervos sem alterações morfológicas.
- ALTERAÇÕES – provocadas por bactéria ou vírus que comprometem direta ou indiretamente o sistema nervoso. Determinam incoordenação de movimentos, dificuldade visual, febre, apatia, perda de consciência, convulsões, paralisia, processos dolorosos ou parestesias, coma e morte. Podemos também constatar o aparecimento de células tumorais e verminoses com comprometimento do sistema nervoso.

De acordo com a espécie, podemos encontrar, como causadores dessas afecções, os seguintes microorganismos: *Streptococcus pneumoniae, klebsiella pneumoneae* e uma variedade de viroses.

Como a relação dos sistemas ou aparelhos referidos não é isolada – existindo uma inter-relação fisiológica entre eles –, as diversas patologias se refletem de uns aos outros, evidenciando manifestações associadas.

Como rotina, são realizados exames de monitoramento, tais como:

- necropsia;
- histopatologia das lesões;
- levantamento de ectoparasitos;
- levantamento de endoparasitos;
- sorologia;
- levantamento bacteriológico.

Em pesquisa bacteriológica:

Coelhos: *Salmonella*
Bordetella
Pasteurella

Cobaia: *Salmonella*
Bordetella

Hamster: *Salmonella*

Rato: *Bordetella*
Pasteurella
Mycoplasma

Camundongo: *Mycoplasma*
Salmonella

Controle de Áreas Biolimpas

O controle de áreas biolimpas começa com princípios que propiciam condições favoráveis para manutenção dessas áreas, onde são criados e mantidos os animais de laboratório.

Para que tal processo seja eficiente, é necessário que todas as etapas sejam normatizadas, para um melhor acompanhamento dos responsáveis técnicos, uma vez que o controle de tais áreas depende de um trabalho conjunto (envolvendo os técnicos da criação e os do laboratório de controle da qualidade animal).

Uma vez traçadas as diretrizes, a operacionalização é imediata. O principal objetivo é identificar pontos de possíveis veículos de contaminação, que podem ser carreados para o interior das áreas limpas.

Com base nessa etapa, avaliar qual o melhor método de verificação e acompanhamento desses pontos.

Coletamos amostras em pontos de difícil limpeza, como também dos tratadores (técnicos) e ainda de todos os locais de maior atuação dos mesmos. O tratador é um dos principais agentes veiculadores de contaminação, caso não sejam cumpridas as normas de higiene estabelecidas.

Como exemplo, temos:

- canto das paredes;
- lâmpadas;
- maçanetas;
- estantes;
- roupas;
- parede;
- luvas;
- dutos de ar (filtros).

Os materiais são coletados com *swabs* estéreis e enviados ao laboratório e acondicionados em caldo nutriente. Posteriormente, são plaqueados em agar sangue e agar Mac Conkey. Em determinadas ocasiões, quando necessitamos obter informações sobre a eficiência da lavagem das salas, realizada pelo técnico, bem como da eficácia do desinfetante, coletamos amostras (*swabs*) dos pontos onde foram lavados. Na próxima etapa, introduziremos os *swabs* em caldo Letheen, que se encarregará de inativar o poder residual do desinfetante e o conseqüente crescimento de microorganismos que, provavelmente, permanecem na forma de esporo. Por fim, plaquear nos meios de phenil ethil e Mac Conkey.

A manutenção das rotinas de higiene nas colônias de criação de animais de laboratório é, sem dúvida, um dos pontos de maior importância para o sucesso de uma criação ou de um experimento.

Deve-se cuidar de todos os materiais que entram na colônia, além da ração e água, para que o trabalho não seja perdido em qualquer etapa.

Todos os estágios de limpeza em um biotério, como troca de gaiolas, limpeza de estantes etc., geram aerossóis que podem conter bactérias; por isso, todo material deve ser limpo fora da área bioprotegida.

Bibliografia

Carter, G. R. & Cole Júnior, J. R. *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Micology*. 5^{th} ed. San Diego: Academic Press, 1990.

De Luca, R. R. et al. *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.

National Research Council. *Companion Guide to Infectious Diseases of Mice and Rats*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1991.

Waggie, K. et al. *Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: NIH Publication, 1994.

Técnica de Necropsia

Celia Virginia Pereira Cardoso

Introdução

Por definição, necropsia (do grego *nekros* = cadáver; *opsis* = vista) significa a abertura e a inspeção detalhada e metódica das cavidades e órgãos do animal morto com o objetivo de determinar a respectiva *causa mortis*.

A morte se caracteriza por fenômenos orgânicos que se exteriorizam rapidamente. A cessação dos movimentos respiratórios, a parada do coração, a perda da consciência e da mobilidade voluntária, bem como o desaparecimento da reação reflexa de estímulos, são sinais imediatos da morte.

O *algor mortis*, o *rigor mortis*, o *livor mortis*, as alterações oculares, a coagulação do sangue, a autólise e a putrefação são modificações que aparecem no corpo do animal, algum tempo após a sua morte, e são denominados de alterações cadavéricas.

Esses processos são esquematizados nas seguintes fases:

- fase da rigidez cadavérica;
- fase dos livores ou manchas cadavéricas;
- fase gasosa;
- fase da coliquação;
- fase da esqueletização.

As três últimas já são de caráter putrefativo.

O *algor mortis*, isto é, o esfriamento do cadáver, se instala 1 a 24 horas após a morte; o *rigor mortis* aparece mais ou menos 3 a 6 horas depois da morte e dura aproximadamente 24 horas, desaparecendo quando surgem os primeiros sinais de putrefação. Esse fenômeno surge primeiro nas pálpebras, depois nos maxilares, logo após no pescoço e finalmente nos demais músculos do corpo. O desaparecimento da rigidez se dá na mesma ordem em que se instala; o *livor mortis* se caracteriza pelo surgimento de manchas violáceas que se localizam nas regiões de declive e faltam nas regiões em que o corpo se apóia. São de forma e tamanho variáveis e bem perceptíveis. Os órgãos comprometidos por essa alteração cadavérica são, em geral, aqueles que ficam do lado em que o animal jaz.

A opacidade da córnea, a retração do globo ocular, por evaporação de líquidos, e o seu fechamento, pela rigidez nos músculos palpebrais, são as alterações do olho que ocorrem após a morte.

A decomposição cadavérica é caracterizada por uma série de fenômenos, tais como manchas da putrefação, timpanismo ou meteorismo da putrefação, enfisema da putrefação, maceração e odor. Todos decorrentes da invasão e da difusão de germes (bactérias) da putrefação pelo corpo, quase sempre de origem intestinal; daí o início dos processos putrefativos na cavidade abdominal.

As manchas da putrefação são de cor verde ou azuladas e irregulares; aparecem na pele e nos órgãos em contato com os intestinos. A cor verde é devida à sulfametaemoglobina, formada pela ação do ácido sulfúrico, que surge das fermentações bacterianas sobre a hemoglobina.

O timpanismo da putrefação é uma distensão por gases que ocorre nas cavidades gastrointestinais e é responsável pelo crescimento do abdômen e pela abertura dos membros, observados nos cadáveres, muitas horas após a morte.

O enfisema cadavérico é o aparecimento de pequenas bolhas gasosas no tecido conjuntivo subcutâneo, sob as cápsulas do fígado, do baço e de outros órgãos.

A maceração da mucosa digestiva é um desprendimento das respectivas mucosas e o pseudoprolapso retal.

O odor da putrefação é por ação da cadaverina e é mais um sinal de decomposição cadavérica.

Material

Nunca se deve utilizar um número excessivo de instrumentos nas necropsias. Usar, apenas, os estritamente necessários.

Tratando-se de necropsia de animais de laboratório convencionais (pequenos roedores e coelho), o material geralmente indispensável é o seguinte:

- cabo de bisturi;
- lâmina de bisturi;
- tesoura reta e ponta fina;
- pinça de dissecção dente-de-rato;
- pinça de dissecção lisa;
- gaze em compressas.

O tamanho dos instrumentos varia de acordo com o tamanho da espécie. Quando fazemos uma necropsia em espécies de médio e grande porte, a esses instrumentos, devem ser juntadas as seguintes peças:

- faca de açougue, em número de duas;
- fuzil, a ser utilizado no afiamento das facas;
- martelo com cabo em gancho;
- serra elétrica ou articulada;
- tábua retangular ou quadrada, com 80 cm aproximadamente, para se colocar as vísceras e facilitar o exame das mesmas.

Uma bandeja deve ser utilizada para se colocar os instrumentos empregados na necropsia, tomando-se cuidado para não deixá-los dentro ou sobre o animal e, assim, provocar acidentes.

É fundamental que o operador, como também o seu auxiliar, estejam devidamente paramentados, usando jaleco, máscara, gorro e luvas cirúrgicas descartáveis. O emprego de luvas grossas de borracha é mais recomendado quando são necropsias dos animais de médio e grande porte para evitar que se rasguem com facilidade. Além disso, elas devem, sempre que possível, ser revestidas de luvas de linho ou algodão, cuja finalidade é tornar os órgãos e o instrumental menos escorregadio e proteger, as de borracha, contra eventuais cortes.

O local da realização da necropsia deve ser, preferencialmente, em uma sala própria para esse fim, devidamente iluminada e ventilada. Quando se trata da necropsia de primatas não-humanos do Velho Mundo, ou de qualquer outra espécie que potencialmente possua risco de contaminação para o operador ou para o meio ambiente, a mesma deve ser realizada em uma capela de fluxo laminar.

Metodologia

É fundamental que um médico veterinário seja responsável pelas necropsias, embora um técnico bem treinado possa também realizá-las sob a supervisão do primeiro. Da mesma forma, é essencial ter conhecimento do histórico do animal antes de iniciar uma necropsia. Evidente que informações sobre o animal, como espécie, linhagem, sexo, idade, peso, cor da pelagem, número e setor de origem ou experimento em que foi utilizado, são importantes e devem ser registradas em formulário próprio.

Esse histórico consiste basicamente dos dados relativos ao seu comportamento, sintomatologia, características ambientais do local onde era mantido e do experimento em que foi utilizado. Muitas vezes, em virtude da comparação do histórico do animal com os achados de necropsia se consegue estabelecer um diagnóstico.

Deve-se sempre ter em mente que exames complementares podem ser necessários, uma vez que a avaliação macroscópica, muitas vezes, é incapaz de detectar todas as lesões. Para isso, recomenda-se que estejam à disposição, durante uma necropsia, os materiais utilizados para exames histopatológico, bacteriológico, parasitológico e bioquímico.

Iniciamos a prática da necropsia com o exame externo do cadáver. Nesse exame, são observadas as alterações cadavéricas, o estado de nutrição do animal e as alterações encontradas na pele e nos orifícios naturais.

A observação das alterações cadavéricas nos permite estimar o tempo entre a morte e a necropsia; o estado de nutrição do cadáver dá indicações muito úteis ao diagnóstico anatomopatológico; um bom estado nutricional sugere uma morte por doença infecciosa aguda, intoxicação aguda ou traumatismo; os estados caquéticos indicam doenças infecciosas crônicas, certas verminoses, senilidade, doenças orgânicas de evolução lenta (câncer etc.).

A pele e os pêlos devem ser examinados em toda a superfície cutânea. Pele pálida indica anemias, ao passo que amarelada indica icterícias. Hemorragias e ulcerações devem ser investigadas. Pêlos luzidios indicam doenças agudas enquanto os opacos indicam doenças crônicas. Presença de alopécia localizada é comum em processos cicatriciais; quando difusa, sugere sarna, e circular, tinhas.

A boca é o primeiro orifício natural a ser examinado. São inspecionados as gengivas, os lábios, a mucosa das bochechas, o céu da boca e a língua. Segue-se com a cavidade nasal, os olhos, o conduto auditivo, o orifício anal, o aparelho genital masculino e feminino e as mamas.

Todas as alterações encontradas, tais como icterícia, aftas, tumorações, corrimentos, secreções, dentre outras, devem ser registradas e devidamente investigadas.

O próximo passo é a abertura propriamente dita do cadáver. Dependendo do porte do animal, pode-se fixá-lo à mesa de necropsia adequada à espécie. Em decúbito dorsal e distendido, expõe-se toda a região ventral do animal. Promove-se a incisão longitudinal da pele sobre a linha mediana, desde a região mandibular até a sínfise pubiana. A pele é rebatida após divulsão e sua textura, quantidade de tecido adiposo subcutâneo e a cor dos tecidos são relevantes dados a serem registrados.

A partir desse momento, deve-se optar pela abertura inicial da cavidade abdominal ou da cavidade torácica e nunca das duas simultaneamente. Isso porque, na eventualidade da existência de líquido, seja em uma, seja em outra cavidade, o mesmo pode transvazar de uma cavidade para outra, confundindo o operador sob a real origem do líquido.

Ao se optar pela cavidade abdominal, a musculatura abdominal é incisada, também sobre a linha média, ou linha alba, desde a altura da cartilagem xifóide até a sínfise pubiana. A seguir, a mesma é seccionada ao longo da linha da última vértebra, tomando-se cuidado para não lesar os órgãos abdominais. Desse modo, a musculatura abdominal pode ser rebatida lateralmente e podem ser observados a cor e a posição dos órgãos abdominais, distensão intestinal, quantidade e características do fluido peritoneal.

Por sua vez, a exposição dos órgãos torácicos é possível, com a abertura da cavidade, sendo promovida por secções laterais do gradil costal, sobre as articulações costocondrais e, após secção do diafragma, pode-se rebater ou retirar o plastrão. Junto do plastrão esternal, observa-se o timo, localizado próximo à base do coração.

Descreveremos agora como remover as vísceras, porém não faremos descrições dos métodos de exame dos aparelhos e sistemas, pois fogem ao objetivo deste capítulo.

Deve-se iniciar a remoção das vísceras, seccionando-se o pavimento da cavidade bucal junto da face interna da asa da mandíbula. Após desarticulação dos ossos hióides, a língua é exposta para que, com o auxílio de uma pinça, seja removida no conjunto língua-esôfago-traquéia-pulmão-coração. O diafragma é seccionado, circundando-se toda sua periferia. A dissecção para retirada dos órgãos é completada pela secção dos ligamentos mediastínicos e dorsais do abdômen até as proximidades da pelve, e a remoção do conjunto de órgãos é obtida após secção do reto. Os órgãos do sistema urogenital são então seccionados separadamente.

A inspeção do sistema nervoso central não é uma conduta comum durante a necropsia de animais de laboratório. Porém, se há história clínica que sugira qualquer anormalidade nessa área, ela deve ser inspecionada. As pequenas espécies de roedores permitem que, após o rebatimento da pele da cabeça, o crânio seja seccionado com o auxílio de tesoura. Dessa forma, e após incisão de sua parte posterior e de ligamentos da base da cavidade cranial, o cérebro pode ser facilmente removido. Para colheita da medula espinhal, o animal deve ser mantido em decúbito ventral e em seguida faz-se a dissecção da pele e musculatura dorsais, desde a região occipital até o osso sacro; daí, seccionam-se as raízes espinhais e as duas extremidades do arco neural, o que permite sua retirada por tração.

Da mesma forma, o sistema músculo-esquelético, assim como outros órgãos, só é examinado detalhadamente se apresentar alguma anomalia.

Colheita de Material

Várias técnicas são empregadas para colheita de material em uma necropsia, dependendo do objetivo da investigação. As mais comuns são:

Colheita de Material para Exame Anatomopatológico

O fragmento do espécime a ser coletado deve ter de 0,5 cm a 1,0 cm de espessura e contemplar o seio de lesão, os limites das mesmas com o tecido normal e as áreas aparentemente normais, circunvizinhas à lesão.

A solução fixadora é, geralmente, a formalina constituída de solução de formol a 10% ou 20%. Porém, como o ácido fórmico é uma impureza nociva à fixação dos tecidos, sugere-se a neutralização do mesmo, através do uso de carbonato de cálcio ou da formalina tamponada (pH 7), cuja fórmula é a seguinte:

Formaldeído	100 ml
Água Destilada	900 ml
Fosfato Sódio Monobásico	4,0 g
Fosfato Sódio Dibásico	12,3 g

O frasco receptor deverá ser de boca larga, para evitar eventuais compressões dos tecidos, e de tamanho suficiente para acondicionar a peça e a quantidade de solução fixadora que é de, aproximadamente, 15 vezes superior ao volume da peça.

Alguns tecidos podem flutuar no fixador (pulmões normais e medula óssea normal, por exemplo); nesses casos, coloca-se um chumaço de algodão ou gaze sobre os mesmos, de modo que haja sua imersão na solução fixadora.

A identificação do material deve estar rotulada no frasco e o seu transporte deve ser com cuidado para evitar o extravio ou a quebra do mesmo.

Colheita de Material para Exame Parasitológico

No exame de ectoparasitos – as sarnas são as mais comuns nos animais de laboratório –, procede-se da seguinte forma: com uma cureta ou um escalpelo, raspam-se até sangrarem (sem chegar à hemorragia franca) os bordos de diversos pontos cutâneos afetados; se possível, os recentemente inflamados. Os raspados são recolhidos em tubo de hemólise ou em outro recipiente que possa ser fechado hermeticamente. Em seguida, remeter o espécime ao laboratório, sendo dispensado qualquer conservador. Pode-se, ainda, obter um fragmento representativo da lesão e enviá-lo, em solução fixadora de formol, para análise.

No exame de endoparasitos, o material pode ser coletado diretamente dos intestinos do animal durante a necropsia, colocados em frascos ou placas de Petri com solução de salina e encaminhados imediatamente para o laboratório. Os cuidados com a identificação e o transporte do material também devem ser observados.

Colheita de Material para Exame Bacteriológico

Este procedimento deve ser feito antes de qualquer interferência sobre o órgão e sob condições de total assepsia, para a qual utiliza-se álcool 70º, ou outra solução anti-séptica, e todos os instrumentos necessários deverão estar estéreis. Sangue, tecidos e também secreções são utilizados para identificação de bactérias. O material deve ser remetido rapidamente ao laboratório, acondicionado de maneira a conservá-lo fresco, ou seja, refrigerado.

Bibliografia

De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Jalmes, C. A. C. et al. *Control de Calidad de Animales de Laboratorio.* Caracas: INHRR, 1997.

Santos, J. A. & Mello, M. R. *Diagnóstico Médico Veterinário*: *colheita de material*. São Paulo: Nobel, 1976.

lternativas para Animais de Laboratório: sistemas *in vitro*

Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques
André Luiz Franco Sampaio

Histórico

Há muitos anos os seres humanos têm utilizado animais para melhor compreender a anatomia, fisiologia e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das doenças. O trabalho médico mais antigo que se tem conhecimento, o *Corpus Hippocraticum* (cerca de 350 a.C.), já contém descrições de experimentos com porcos. No entanto, a partir de meados do século XIX, a experimentação animal ganhou um novo ímpeto, principalmente, devido aos avanços nas ciências básicas da medicina, tais como a anatomia e fisiologia, e não como se imagina, pelo desenvolvimento de novas terapias e imunoprofilaxias.

A primeira tentativa para vacinação foi feita na China, logo no início do século VI d. C., baseada em observações em seres humanos. Um dos primeiros textos sobre medicina chinesa, The golden mirror of medicine, lista diversas formas de inoculação contra varíola, tais como inalação de raspas de escaras de varíola e a introdução de um pedaço de algodão com conteúdos da vesícula da varíola no nariz (Plotkin & Plotkin, 1988).

Uma Abordagem Científica para o Desenvolvimento de Vacinas e Medicamentos

A primeira tentativa científica para controlar uma doença infecciosa através de inoculação sistemática é atribuída a Edward Jenner. Após 25 anos de estudos, Jenner publicou seus achados sobre varíola e varicela em 1798 (Jenner, 1798). Esta publicação também contém resultados de seu experimento realizado em 1796, no qual um menino de oito anos de idade, chamado James Phipps, foi inoculado com material de varicela e, em seguida, inoculado com o vírus da varíola.

Tal como diversos outros desenvolvimentos da medicina, a introdução da vacinação contra a varicela encontrou muito ceticismo. Porém, com o passar dos anos, esse método encontrou ampla aplicação. É interessante notar que o estudo de Jenner foi completamente baseado em observações em seres humanos e experimentos envolvendo animais não contribuíram de forma alguma nesses resultados.

Passaram-se 84 anos entre a proposta de Jenner para vacinação de varíola e o desenvolvimento de uma primeira vacina baseada em pesquisa científica, a vacina contra cólera, desenvolvida por Pasteur em 1880.

Durante esse tempo, o campo da pesquisa não estava parado. No geral, a maior atenção era dedicada ao desenvolvimento de estudos comparativos de patologia e a tentativa de compreensão da etiologia de doenças. A crença inicial de que um miasma (uma emanação malévola) era o causador das doenças foi substituída pela compreensão de que as infecções poderiam ser causadas por organismos vivos.

Em 1840, o patologista e anatomista alemão Jacob Henle (1809-1885) publicou seu trabalho sobre doenças contagiosas, no qual demonstrava que organismos vivos, e não miasmas, eram os causadores de doenças.

Ele concluiu que, para estabelecer a associação entre o agente causal e a infecção, é essencial cultivar o microorganismo fora do agente hospedeiro (apud Brown, Cussler & Hendriksen, 1996).

O postulado de Koch, publicado em 1884, tem importância histórica com relação ao papel de animais de experimentação no estudo de doenças infecciosas; ele estabelece o critério para co-relacionar um microorganismo com uma infecção e inclui o isolamento do microorganismo em cultura pura, a partir de material coletado de um paciente, seguido pela introdução da cultura em um animal experimental apropriado. O postulado de Koch ganhou uma aceitação geral na microbiologia e ajudou a estabelecer as bases para o intenso uso dos animais de laboratório.

O uso de animais de experimentação assumiu então, a partir dessa data, uma posição-chave na clínica e na patologia experimental. A necessidade de bons modelos experimentais utilizando animais aumentou quando se descobriu que nem todas as espécies são igualmente sensíveis aos microorganismos patogênicos. Por exemplo, Koch utilizou camundongos, cobaias e coelhos em seus estudos sobre carbúnculo maligno, levando rapidamente ao desenvolvimento de uma vacina. Nos casos em que foi difícil encontrar um modelo animal adequado, como no caso da poliomielite, as investigações estagnaram durante muitos anos. Entretanto, resultados rápidos também foram obtidos na pesquisa com a difteria, quando encontrou-se um modelo relativamente simples em cobaias (Hendriksen, 1988).

No Quadro 1, podemos observar a intensificação das descobertas a partir da introdução da experimentação em animais de laboratório.

Quadro 1 – Fatos importantes no estudo de doenças infecto-contagiosas

ANO	DESCOBERTA
1796	Edward Jenner descreve a vacina contra varíola através de observações e experimentações em seres humanos
1840	Jacob Henle descreve o microorganismo como agente causal das doenças
1880	Pasteur desenvolve a vacina contra cólera
1881	Pasteur desenvolve a vacina anti-rábica
1884	Koch isola o agente causador da tuberculose e publica o postulado de Koch
1894	Roux e Martin desenvolvem a vacina contra difteria
1928	Fleming descobre a penicilina
1949	Enders, Weller e Robbins descrevem a primeira vacina contra poliomielite

Bem-Estar dos Animais e o Interesse em Alternativas para os Testes em Animais de Laboratório

As implicações éticas da experimentação animal foram debatidas violentamente desde o início. Em 1760, o fisiologista inglês Ferguson (1710-1776) descreveu o tratamento bárbaro a que animais eram submetidos em alguns experimentos.

As reflexões sobre relação entre homem e animal foram grandemente influenciadas pelos conceitos éticos formulados por Jeremy Bentham (1748-1832). Bentham considerava a capacidade de sofrer dos animais como uma característica essencial para que fossem tratados com benevolência. A Inglaterra era o centro da oposição aos animais de experimentação e, em 1842, foi criada a Sociedade Britânica para Prevenção da Crueldade com Animais, considerada a primeira sociedade mundial protetora de animais.

No entanto, o desenvolvimento da ciência médica e, sobretudo, a descoberta da vacina contra difteria, causaram profundo impacto na opinião pública. O fato de que pesquisas envolvendo animais levaram à

prevenção de uma doença que vitimava milhares de crianças anualmente, convenceu até mesmo os críticos mais aficcionados da necessidade de tais estudos. Apesar disso, a oposição ao uso de animais de experimentação sempre esteve presente, com períodos de declínio e reincidência.

Porém, com o advento do desenvolvimento de vacinas e dos primeiros antibióticos, teve início um uso muito mais intenso e sistemático de animais de experimentação. Estes passaram a ser utilizados em ensaios para o desenvolvimento de novas vacinas, na busca de novos medicamentos eficazes contra dezenas de doenças e, também, no controle de qualidade das vacinas e dos medicamentos já desenvolvidos. A sociedade passou a ficar preocupada, então, com a quantidade de animais e o tipo de tratamento recebido por eles durante esses ensaios.

Tratamento Humanitário

Os pesquisadores ingleses Russel & Burch (1959) publicaram *O Princípio da Técnica Experimental Humanitária* e introduziram o conceito dos 3Rs.

- *Replacement* – substituição de espécie por outra mais abaixo na escala zoológica ou para microorganismos, ou, se possível, para material não biológico;
- *Reduction* – redução do número de animais utilizados;
- *Refinement* – refinamento das técnicas para minimizar o nível de estresse e dor causada ao animal durante a experimentação.

Esse trabalho de conscientização teve grande repercussão em diversos países do mundo e em diversos estratos da sociedade, mudando a visão das pessoas sobre o uso dos animais e levando a uma reflexão se o uso de animais de laboratórios poderia ser minimizado.

Não é apenas a pesquisa científica básica que faz uso de animais de experimentação. Os maiores usuários são as indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Essas indústrias demandam milhares de animais anualmente, que são utilizados nos diversos testes solicitados por organismos mundiais para a investigação da segurança de uso e validação dos produtos fabricados. A utilização dos animais para os testes toxicológicos de novos produtos farmacêuticos e cosméticos tem sido alvo de grandes protestos mundiais. De um lado estão as sociedades protetoras, contra os testes; de outro, a indústria e até mesmo alguns órgãos governamentais, defensores da necessidade dos testes para garantir a segurança e a eficácia dos produtos fabricados.

Atualmente, há um grande movimento internacional, baseado nos 3Rs, para a validação e a aplicação de novas técnicas, especialmente *in vitro*, para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, cosméticos e imunobiológicos. Atendendo a pressões de organismos internacionais, as indústrias farmacêuticas e de cosméticos têm sistematicamente adotado metodologias mais modernas que atendam aos 3Rs para o desenvolvimento de seus produtos.

Os 3Rs no Desenvolvimento de Imunobiológicos e Fármacos

A indústria de imunobiológicos também é uma grande usuária de animais na produção de vacinas, além dos testes de eficácia e segurança. Hoje, com a adoção de sistemas *in vitro* de cultura de células, pode-se substituir completamente o uso de animais ou seus derivados para as fases de produção e testes de algumas vacinas. O Quadro 2 ilustra alguns casos nos quais métodos alternativos podem ser utilizados para a substituição, ou pelo menos redução do uso de animais, na produção de vacinas.

Quadro 2 – Métodos alternativos para a substituição ou redução do uso de animais na produção ou teste de vacinas

VACINA	ANIMAL OU MÉTODO						
	Macaco	Cachorro	Coelho	Camundongo	Células humanas	Ovos com embrião de galinha	Teste de Floculação
Adenovírus	P				P T		
Difteria							T
Catapora	P	P			P	P	
Pólio	P T				P		
Raiva			P		P T	P	
Rubéola	P	P	P		P	P	
Varíola			T		P	P T	
Tétano				T			T
Febre Amarela				T	P T		

P – Produção; T – Teste.

Na indústria farmacêutica, o uso de animais permitiu o desenvolvimento de medicamentos para as mais diversas enfermidades e doenças durante muitos anos. Entretanto, novos métodos têm sido aplicados no desenvolvimento de novos fármacos, especialmente na fase de descobrimento e, em alguns casos, nos estudos toxicológicos. Na indústria farmacêutica, e também de cosméticos, um dos grandes vilões é o teste de Draize, amplamente utilizado e recomendado por organismos internacionais para a determinação do potencial irritante de produtos nos olhos.

Atualmente, alguns métodos *in vitro* tentam minimizar o teste de Draize mediante a avaliação dos produtos em sistemas de cultura de tecidos ou células (fibroblastos). Esses testes podem detectar o grau de irritabilidade dos produtos, servindo como um pré-teste, evitando assim o uso excessivo de animais. Entretanto, o uso mais amplo dessas metodologias ou a substituição do teste de Draize ainda são motivos de acirrados debates no meio científico.

Uma das áreas que mais obteve sucesso na utilização dos 3Rs foi a pesquisa de novos fármacos. A indústria farmacêutica conta hoje com sistemas robotizados capazes de processar milhares de amostras por dia, sendo capazes de testar essas amostras em diversos alvos moleculares ou celulares para o desenvolvimento de novos fármacos. Os modelos utilizados para os ensaios podem compreender sistemas enzimáticos, essenciais para o desenvolvimento de algumas doenças ou para a sobrevivência de parasitas vírus, ou ainda sistemas de culturas de células, em particular as tumorais, para o desenvolvimento de novos quimioterápicos. Esses ensaios permitem a avaliação de grande quantidade de amostras em curto prazo e, apesar de não serem definitivos, podem orientar a continuidade da pesquisa. Na seqüência, são realizados ainda ensaios *in vitro* mais sofisticados e, só então, iniciam-se os estudos com animais de laboratório começando-se sempre com animais de pequeno porte como camundongos, ratos e cobaias.

Avaliação Farmacológica Primária – Ensaios *In Vitro*

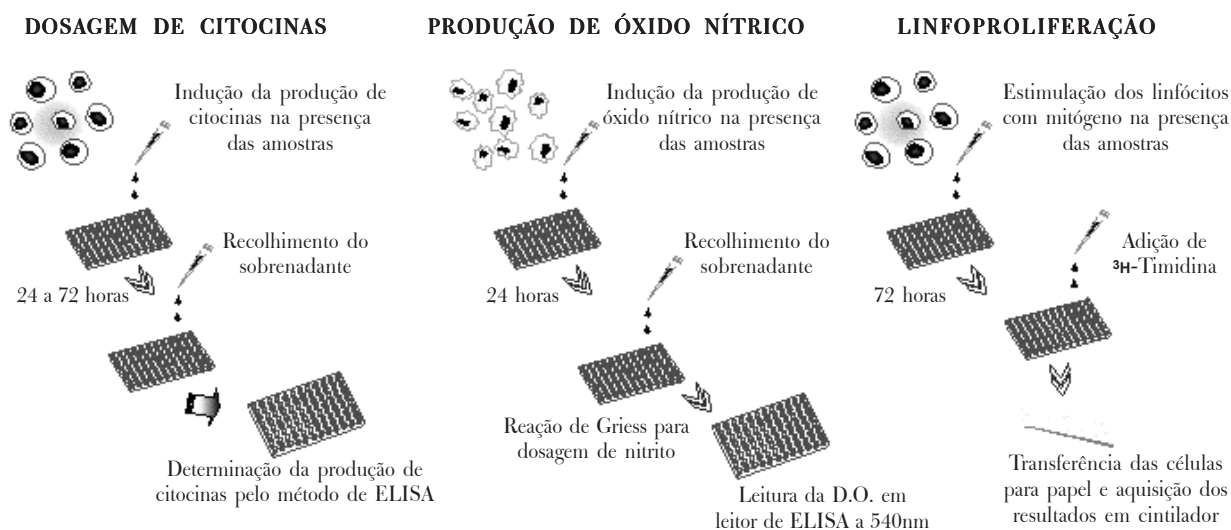
Na busca de produtos naturais ou sintéticos com atividade antiinflamatória, imunomoduladora, antineoplásica ou contra parasitos protozoários, pode-se utilizar diferentes ensaios *in vitro* para a determinação da atividade biológica dessas moléculas.

Avaliação da Atividade Antiinflamatória ou Imunorreguladora

Na avaliação primária de compostos com atividade antiinflamatória ou imunorreguladora, podem ser feitos ensaios utilizando linhagem de células mantidas em cultura, substituindo por completo o uso de animais neste passo, avaliando-se a produção de óxido nítrico, proliferação de linfócitos e produção de citocinas. Esses ensaios são bastante informativos já que tanto o óxido nítrico como as citocinas possuem uma participação, seja em processos inflamatórios, seja em respostas imunes.

Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um mediador inflamatório produzido quando macrófagos, entre outras células, são ativados (Fig. 1). O NO pode atuar tanto no desenvolvimento de reações inflamatórias quanto na atividade bactericida ou antiparasitária dessas células. Quando alguma substância consegue inibir a sua produção, isso indica um potencial papel antiinflamatório. No entanto, se alguma substância for capaz de aumentar a sua produção, isso pode ser um indicativo de uma potencial atividade estimuladora das atividades antiparasitária ou bactericida dos macrófagos.

Figura 1 – Ensaios que podem ser utilizados na descoberta de novos fármacos como alternativa ao uso de animais

Elaboração: André L. F. Sampaio

Produção de Citocinas

As citocinas constituem uma família de peptídeos com diversas atividades biológicas e são produzidas, principalmente, por linfócitos e macrófagos. A regulação da produção de diferentes citocinas pode desempenhar um papel tanto antiinflamatório como imunomodulador. Na Fig. 1 está representada uma metodologia que pode ser utilizada para se avaliar o efeito de novos compostos sobre a produção de citocinas. Entre as citocinas que podem ser avaliadas, podemos citar: interleucina (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, o fator de necrose tumoral e o interferon-g.

Proliferação de Linfócitos

A avaliação da capacidade de um composto em inibir a proliferação de linfócito fornece uma informação fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos imunossupressores. Esses fármacos têm aplicação fundamental no tratamento de doenças auto-imunes e na rejeição de transplantes. Nessas situações, ocorre uma multiplicação e ativação exagerada dos linfócitos que passam a ter uma atuação nociva ao organismo. Nesses experimentos, os animais servem de fonte de células para os ensaios.

Avaliação da Atividade Antineoplásica

Na busca de novos medicamentos contra neoplasias, pode-se iniciar os testes com ensaios sobre alvos moleculares, relacionados com a resistência das células tumorais à quimioterapia convencional, ou com linhagens de células tumorais em cultura. Existem diversas linhagens desenvolvidas a partir de tumores malignos de camundongos, macacos e seres humanos que hoje são mantidas exclusivamente em cultura, muitas delas resistentes a múltiplas drogas antitumorais. A proliferação dessas células pode ser avaliada frente a diferentes concentrações da amostra que se pretende testar, monitorando a sobrevida e a taxa de multiplicação celular. Quanto mais eficaz for uma substância em matar a célula em cultura ou impedir sua proliferação, maior será seu potencial como fármaco contra neoplasias. A grande vantagem do uso dessa metodologia reside na diminuição do número de substâncias para testes posteriores em animais, já que tais testes podem ser extremamente agressivos, dependendo da linhagem tumoral inoculada nos animais.

Atividade contra Parasitas

Pode-se também testar amostras contra o crescimento de parasitas *in vitro*. Esses testes podem ser feitos tanto em culturas puras dos parasitas como em cultura de células infectadas. Em tais experimentos, avalia-se a capacidade da amostra em matar o parasito diretamente, ou após a interação do parasito e as células em uma cultura mista. Caso uma amostra mostre-se capaz de matar o parasito nessas condições, a ela é atribuída uma atividade farmacológica que permite o prosseguimento dos estudos.

Home Pages de Interesse

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)
http://iccvam.niehs.nih.gov/home.htm
http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/iccvam/toc.html

Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments
http://www.frame.org.uk/index.htm

Development of Alternatives to Animal Use for Safety Testing and Hazard Assessment
http://www.solutions-site.org/cat9_sol103_5.htm

Alternatives for Animal Testing on the Web
http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm

Foundation for biomedical research
http://www.fbresearch.org/index.html

Center for alternatives to animal testing
http://caat.jhsph.edu/pubs/animal_alts/preface.htm

Referências Bibliográficas

Brown, F.; Cussler, K. & Hendriksen, C. F. M. (Eds.). *Replacement, Reduction and Refinement of Animal Experiments in the Development and Control of Biological Products: developments in biological standardization*. Basel: Ed Karger, 1996. v.86.

Hendriksen, C. F. M. *Laboratory Animals in Vaccine production and Control, Replacement, Reduction and Refinement*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988.

Jenner, E. *An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae*. London: Samson Low, 1798.

Plotkin, S. L. & Plotkin, S. A. A short history of vaccination. In: Plotkin, S. A. & Mortimer, E. A. (Eds.) *Vaccines.* Philadelphia: WB Saunders Company, 1988.

Russel, W. M. S. & Burch, R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen, 1959.

Criação e Produção de Animais Transgênicos e Nocautes

Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

Introdução

Animais transgênicos são aqueles cujo genoma foi modificado pela introdução de seqüências de DNA de outro organismo. Muitas vezes tais seqüências são manipuladas por engenharia genética de tal forma que constituem uma mistura de pedaços de DNA vindo de diversas origens.

No caso de animais nocautes, a modificação genética introduzida é capaz de interromper ou anular um gene que, então, não mais se expressa, sendo denominado de nocauteado.

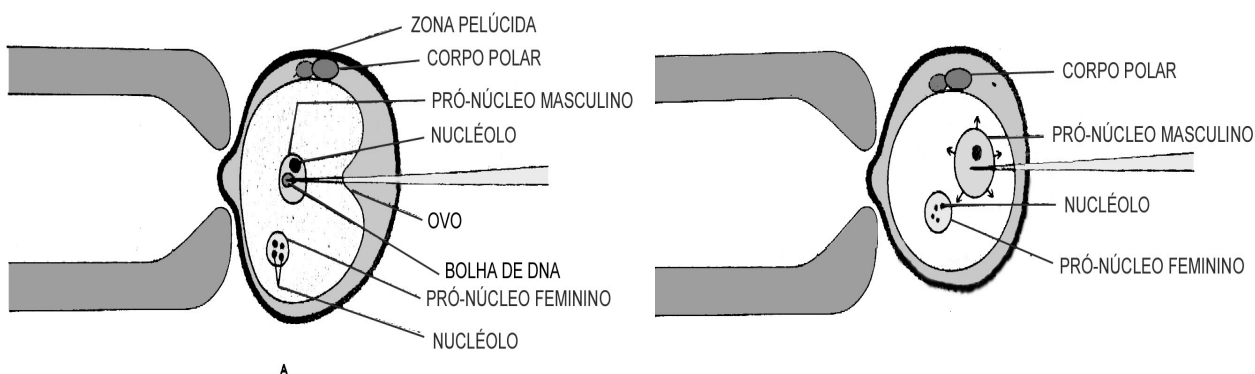
A idéia de se introduzir material genético em um embrião data da década de 70 do século XX quando a tecnologia de DNA recombinante se tornou uma realidade. As primeiras tentativas se valeram da infecção por vírus que carreavam em seu interior pedaços de DNA exógenos, mas logo as técnicas de microinjeção revolucionaram a capacidade de se introduzir um gene clonado no interior do núcleo do embrião.

Hoje em dia algumas metodologias são utilizadas na produção de um camundongo transgênico, como:

Microinjeção no Pró-Nucleo Masculino

A microinjeção no pró-nucleo consiste na introdução de uma solução de DNA diretamente no pró-nucleo de um oócito recém-fecundado. Em cerca de 30% dos oócitos assim manipulados, o DNA exógeno vai se integrar no genoma e embriões transgênicos serão produzidos.

OBS.: animal nocaute é um animal que é nulo para um determinado gene, ou seja, esse gene teve seus alelos modificados geneticamente de modo a não mais produzirem uma proteína ativa.

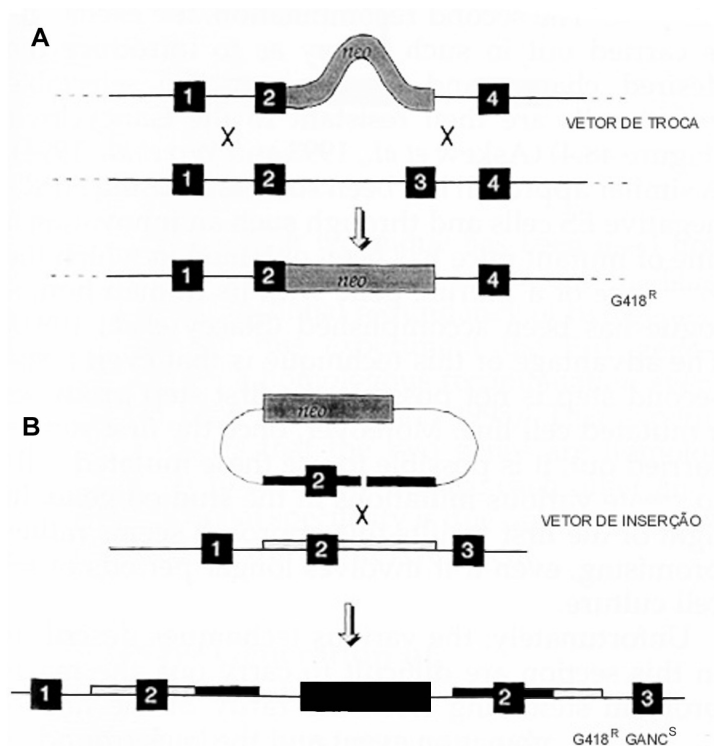
Figura 1 – Esquema de microinjeção pró-nuclear

A) Introdução da agulha de microinjeção no pró-núcleo masculino do ovo fertilizado.

B) Após a injeção, verifica-se o aumento do pró-núcleo. Em ambos os casos o ovo está mantido em posição por uma pipeta de sustentação (Hogan et al., 1994).

Transgênese Mediada por Células ES

Uma maneira diferente de se introduzir genes exógenos em uma linhagem de camundongo é pela transformação inicial de células-tronco embrionárias e posterior introdução dessas células no embrião em fase de mórula ou blastocisto. As células totipotentes utilizadas nesses experimentos são as células ES (*Embryonic Stem Cell*). Células ES são células obtidas da massa interna de um blastocisto e que são mantidas em sua forma indiferenciada, podendo gerar toda e qualquer célula do organismo. Em geral o transgene contém, além do DNA a ser estudado, um gene de resistência a drogas (neomicina) e um gene-repórter como o gene Lac Z de *Escherichia coli* ou GFP. Esse transgene é transferido para as células ES por eletroporação e 1% destas terão de uma a várias cópias do DNA exógeno integrado. Após a eletroporação, aquelas que contêm o transgene serão selecionadas pela presença do antibiótico no meio de cultura. As células transformadas serão então injetadas para a formação de um embrião quimérico, isto é, formado por células ES transformadas e células do embrião recipiente.

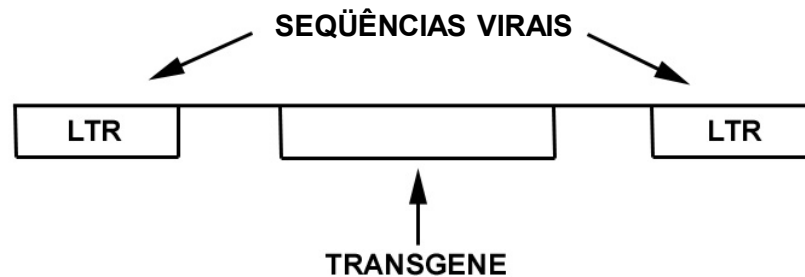
Essa técnica é a única que pode ser utilizada para fazer o nocaute de um gene, uma vez que a troca do gene normal pelo DNA exógeno que irá anular o gene ocorre por recombinação homóloga e esse fenômeno acontece em maior freqüência nas células ES.

Figura 2 – Modificação genética introduzida em um lócus

Fonte: modificado de Stephane Viville em Houdebine (1997).

A) Modificação por troca do DNA no lócus.
B) Modificação do lócus pela inserção de um fragmento de DNA.

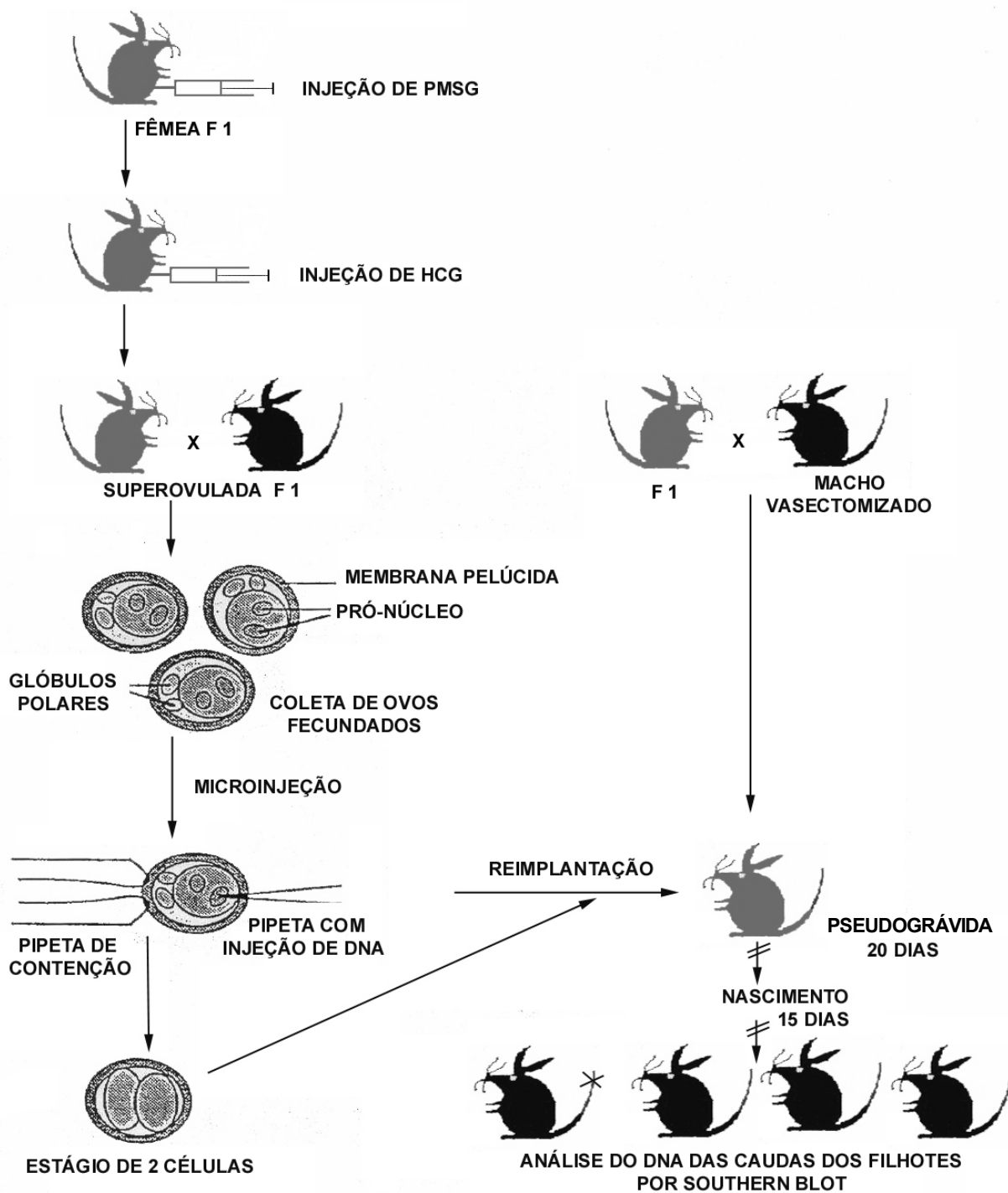
Infecção por Retrovírus

Neste caso, o DNA exógeno deve ser inserido num vetor retroviral que será, então, injetado diretamente no oócito fertilizado.

Figura 3 – Construção retroviral para transferência de um transgene

Outras metodologias têm sido tentadas alternativamente, mas com menor eficiência.

Em todos os casos o primeiro passo dessa tecnologia consiste na obtenção de oócitos fertilizados ou embriões no início do desenvolvimento. Tendo em vista que cada fêmea de camundongo produz, por ciclo, cerca de 8 a 12 ovos que serão liberados naturalmente, torna-se necessário encontrar maneiras de se aumentar o número de ovos obtidos. Isso é possível estimulando as fêmeas com um regime hormonal; este consiste na injeção de 5UI de PMS (*pregnant mare serum*) e 46 horas após 5UI de HCG (*human chorionic gonadotrophin*).

O acasalamento das fêmeas logo após a última injeção pode levar à obtenção de 30 a 60 ovos de cada fêmea dependendo da linhagem utilizada. Desses ovos, aqueles que estiverem fertilizados poderão ser, então, utilizados para microinjeção. No caso de se estar trabalhando com a transgênese via células ES, os ovos só deverão ser recuperados nos estágios de mórula ou blastocisto (2,5 ou 3,5 dias pós-coito) quando serão injetados com as células ES transgênicas. Nos dois casos, os ovos ou embriões injetados deverão ser reimplantados em camundongas barriga de aluguel. Estas são pseudográvidas obtidas pelo cruzamento de fêmeas no período de estrus com machos vasectomizados. A implantação se dará na ampola do oviduto, para os oócitos fertilizados; no oviduto para as mórulas, e no útero para os blastocistos.

Figura 4 – Esquema geral da obtenção de um fundador portando um transgene

Portanto, um aspecto importante para se produzir animais transgênicos é o acesso a um biotério de qualidade que forneça uma quantidade razoável de camundongos de idades e linhagens determinadas.

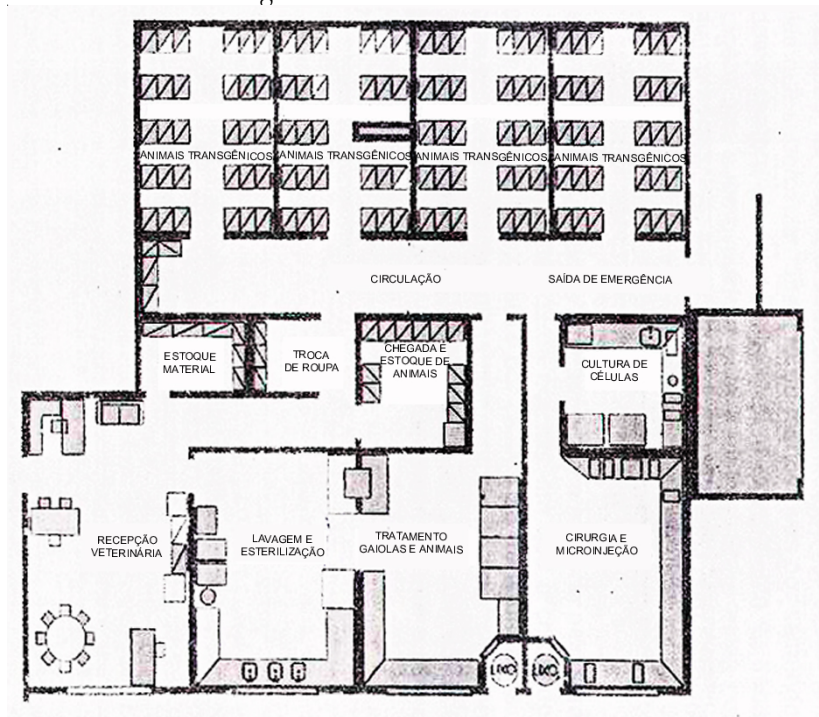
O Biotério Ideal para se Criar Animais Transgênicos

Idealmente todo animal de experimentação deve ser mantido num ambiente livre de patógenos como vírus, bactérias e parasitas que podem alterar os resultados de um experimento. No caso de animais transgênicos é ainda mais importante a qualidade do biotério, tendo em vista que eles são mais frágeis devido à manipulação genética. Portanto, um biotério projetado especialmente é o ideal quando se deseja produzir ou criar animais transgênicos.

Nos casos mais restritos, como quando se estabelecem colônias de camundongos nocautes para genes imunológicos, barreiras devem ser criadas para se aumentar o isolamento da colônia. Nesses casos, os bioteristas e pesquisadores devem tomar uma ducha e trocarem toda a vestimenta ao entrar no biotério. Todo o material de consumo como água, comida, maravalha, suplementos, gaiolas etc. devem ser autoclavados antes de penetrar no ambiente. Os animais vindos de outros laboratórios ou fornecedores devem passar por uma quarentena e serem testados para diferentes patógenos. Em casos em que a imunidade dos animais não está em questão, barreiras menos rígidas são exigidas. Por exemplo, o banho dos que adentram o biotério pode ser eliminado. No entanto, quando os animais são extremamente frágeis, o melhor é manter a colônia pequena e dentro de isoladores. O mesmo deve ser feito quando o problema for a saúde do experimentador e não a do animal.

Um aspecto importante é a climatização do biotério. Biotérios com patógenos controlados, geralmente, têm de manter as salas de animais com pressão positiva para que os germes tenham dificuldade de entrar. Porém, biotérios que mantenham animais geneticamente modificados devem, por lei, manter uma pressão negativa em relação ao meio ambiente, uma vez que o que deseja conter são os animais modificados. Assim sendo, num projeto de biotério em que se mantenham animais do tipo selvagem e aqueles geneticamente modificados deve-se pensar em ter salas com pressão positiva e filtros esterilizantes para se manter as colônias selvagens e os animais imunologicamente deficientes. Entretanto, animais modificados que possam representar um risco para o meio ambiente ou para o homem devem ser mantidos em salas com pressão negativa. O biotério como um todo por sua vez deve ser mantido em pressão negativa em relação ao meio externo.

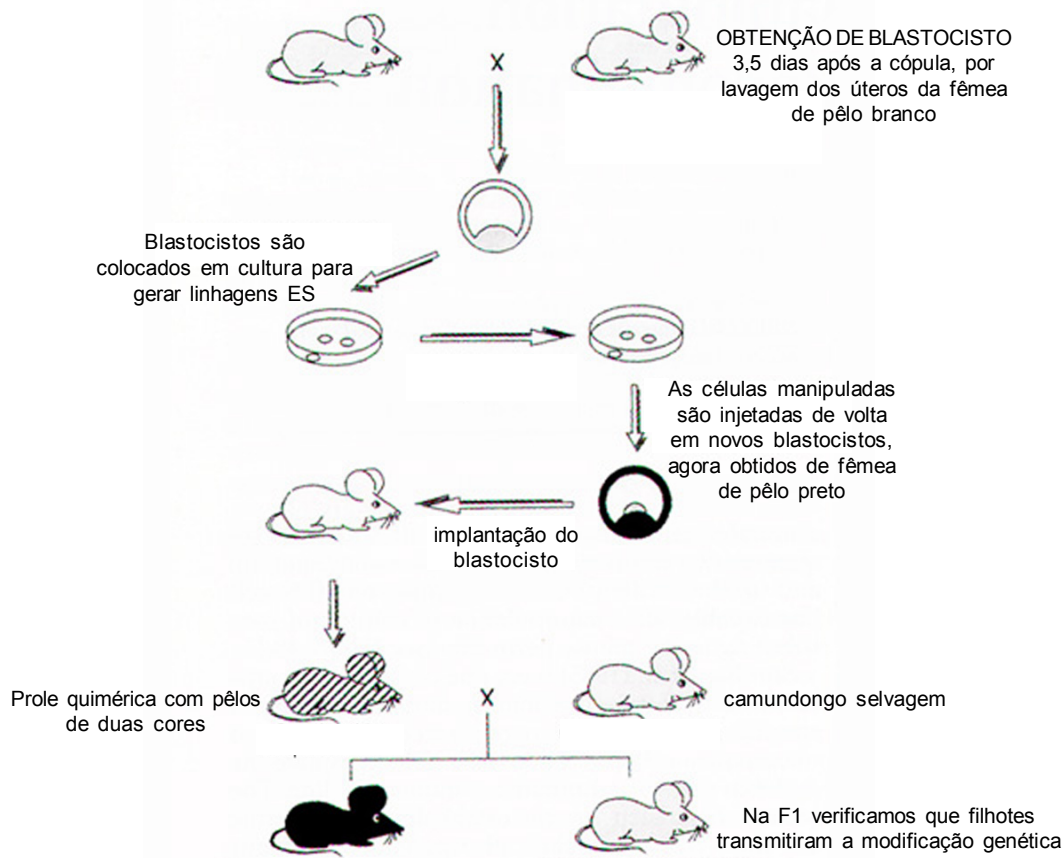
Um desenho que pode ser tomado como modelo para um biotério desse tipo pode ser visto na figura a seguir.

Figura 5 – Planta de um biotério de transgênicos

Que Animais Devem Ser Utilizados na Produção de Transgênicos

O *background* genético parece ter influência na penetração de um fenótipo nocauteado; portanto, muitas vezes linhagens específicas têm de ser utilizadas.

Em princípio, qualquer linhagem de camundongo pode ser modificada geneticamente, mas algumas apresentam vantagens experimentais. Linhagens *inbred* ou híbridas F_1 variam em relação ao número de ovos que produzem após superovulação. Geralmente, elas podem ser divididas em duas categorias, as que são boas superovuladoras (colocam 40 a 60 ovos por camundonga) e aquelas que superovulam mal (15 ou menos ovos por camundonga). Como o número de ovos obtidos é sempre um fator limitante num experimento de transgênese, deve-se escolher uma linhagem boa superovuladora para trabalhar. Entre estas podemos citar a C57BL/6J, a BALB/cByJ, a 129/SvJ ou ainda híbridas de C57BL/6J com CBA/CaJ, DBA/2J ou BALB/cByJ.

A decisão de qual dessas linhagens utilizar levam em conta se a cor do pêlo será um indicador da transgênese. Isso ocorre nos experimentos de nocaute em que o camundongo gerado é uma quimera formada por células do blastocisto e por células ES transformadas. Para se ter uma noção de quanto as células ES transgênicas contribuíram no desenvolvimento do animal, basta utilizar, por exemplo, células de um camundongo de pêlo marrom num blastocisto obtido de camundongo de pêlo preto. A quimera resultante apresentará o pêlo de duas cores, como pode ser visto na figura a seguir.

Figura 6 – Esquema geral de obtenção de quimeras

Fonte: modificado de Stephane Viville em Houdebine (1997).

Para se maximizar o número de ovos obtidos de camundonga superovulada, deve-se cruzá-la com machos que tenham uma alta contagem de esperma e uma boa capacidade de cópula. Esses machos são mantidos em gaiolas separadamente.

Portanto, o biotério de transgênicos deverá manter camundongos, para diversas finalidades, que podem ser de linhagens diferentes como listado a seguir:

Fêmeas Jovens para Produção de Ovos Fertilizados

Como dissemos anteriormente, várias linhagens *inbred* ou híbridas podem ser utilizadas nessa etapa. Para se produzir o número necessário de fêmeas jovens (± 3 semanas) para superovulação, é necessário um número de 20 gaiolas contendo um macho e uma fêmea que irão produzir uma progênie de cerca de 20 fêmeas por semana para experimentação.

Machos Férteis

Cerca de 20 gaiolas contendo machos jovens e férteis de pelo menos 8 semanas devem ser mantidas no biotério de transgênese. Esses machos serão utilizados para cópula com as camundongas superovuladas. Eles podem ser híbridos como estas ou *inbred* de uma das linhagens utilizadas para a produção das híbridas.

Machos Vasectomizados

Machos estéreis são necessários para geração de camundongas pseudográvidas. Eles são vasectomizados e qualquer linhagem com boa capacidade de cópula pode ser utilizada. Após a vasectomia, eles devem ser testados para sua esterilidade antes de serem utilizados para experimentos. Para se obter 4 a 8 fêmeas pseudográvidas 5 dias por semana, são necessários cerca de 20 machos estéreis a serem mantidos em gaiolas separadas.

Fêmeas para Servirem como Recipientes

Fêmeas pseudográvidas são preparadas pelo acoplamento de fêmeas em estrus natural com machos vasectomizados. As fêmeas devem ter, no mínimo, 6 semanas e pesar ao menos 20 g sem serem muito gordas. Fêmeas de algumas linhagens apresentam vantagens como recipientes. Por exemplo, camundongos CD1 (Charles River Laboratories) têm ampolas muito largas que ajudam na transferência para os ovidutos e híbridas F1 (B6x x CBA) são ótimas mães e são capazes de manter ninhadas tão pequenas como dois filhotes.

Como, em geral, cada fêmea entra em estrus e ovula a cada 4 a 5 dias, numa colônia 20% a 25% das fêmeas estará em estrus a cada dia. Desse modo, são necessárias pelo menos 50 fêmeas de idade entre 2 a 5 meses para a produção de cerca de 20 *plugs* por semana.

Referências Bibliográficas

Hogan, B. et al. *Manipulating the Mouse Embryo*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

Houdebine, L. M. (Ed.). *Transgenic Animals – generation and use*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997.

Bibliografia

Joyner, A. L. *Gene Targeting – a pratical approach*. Oxford: IRL Press, 1995. (The Pratical Approach Series)

lternativas para Animais de Laboratório: uso de animais não-convencionais – roedores silvestres

Paulo Sergio D'Andrea
André Luiz Rodrigues Roque
Bernardo Rodrigues Teixeira

Introdução

Os animais silvestres e seus parasitos têm recebido, recentemente, especial atenção por causa do surgimento de 'novas doenças humanas', conhecidas por doenças infecciosas emergentes, ou no caso de enfermidades consideradas anteriormente controladas no meio urbano, re-emergentes (Spear, 2000; Daszak, Cunningham & Hyatt, 2000, 2001). A expansão desordenada das fronteiras agrícolas, a fragmentação de hábitats naturais e a popularização do ecoturismo têm levado o homem a um maior contato com ciclos já estabelecidos entre animais silvestres e seus parasitas, permitindo a formação de um gradiente contínuo de transmissão entre esses três segmentos (Deem et al., 2000; Fayer, 2000).

Apesar de importantes, são raros os estudos de interação parasito-hospedeiro que empregam como modelo experimental os reservatórios naturais (Bastos et al., 1984; Scott & Lewis, 1987; Machado e Silva et al., 1991; Souza et al., 1992; Maldonado et al., 1994; Ribeiro et al., 1998). Isso se deve, certamente, às dificuldades de se padronizar, em condições de laboratório, o manejo adequado para a manutenção de colônias e produção de animais para experimentação. Desse modo, essas resultam, quase que invariavelmente, em colônias efêmeras, mantidas somente durante o período de experimentação sem que se disponibilize, para o meio científico, as informações sobre a criação dos animais.

O conhecimento sobre a biologia dos hospedeiros é fundamental antes de se iniciar os estudos sobre o parasitismo. Como exemplo, citamos os estudos da interação de *Didelphis marsupialis* com *Trypanosoma cruzi,* que esclareceram numerosos aspectos, ainda inéditos, da biologia desse marsupial (Deane, Lenzi & Jansen, 1984; Motta, 1988; Jansen et al., 1991, 1997). Tais parâmetros biológicos são básicos nos estudos epidemiológicos que envolvam a ecologia de populações de reservatórios (Bonvicino et al., 1996; Gentile et al., 2000; D'Andrea, Gentile & Cerqueira, 1999; D'Andrea et al., 1999, 2000).

O objetivo deste capítulo é abordar, de forma sintética e pedagógica, a questão da utilização de roedores silvestres como modelos experimentais alternativos, principalmente para estudos sobre parasitos que afetam o homem.

Por Que Utilizar Roedores Silvestres

A utilização experimental de reservatórios silvestres permite abordar o fenômeno do parasitismo de maneira mais próxima às condições em que ele ocorre na natureza, permitindo a avaliação da patogenicidade de um agente no seu microambiente natural (roedor silvestre). Evita-se, assim, a artificialidade dos estudos que empregam os modelos tradicionais. Aspectos essenciais a serem obtidos, nesse tipo de estudo, incluem a

ecologia do agente, a susceptibilidade ou resistência do organismo, bem como os mecanismos moleculares dessa interação. Um melhor entendimento das relações entre parasito-hospedeiros pode fornecer, ainda, subsídios para o controle mais efetivo de endemias que afetam o homem.

Roedores são modelos adequados se considerarmos as facilidades de criação e manutenção em condições de biotério (pequeno porte, tempo de geração curto, fácil manuseio e boa adaptabilidade ao cativeiro). Além disso, são encontrados nos ambientes de interface doméstico/silvestre e, freqüentemente, são apontados como hospedeiros de diversos patógenos de caráter zoonótico (Cordeiro, Sulzer & Ramos, 1981; Rodrigues e Silva et al., 1992; Pinho et al., 2000).

Outro ponto que deve ser enfocado e que reforça a necessidade desses estudos se refere ao parasitismo como regulador de populações de animais silvestres e seu papel na conservação das espécies (Grenfell & Gulland, 1995; Koella, Agnew & Michalakis, 1998; Thomas et al., 2000; Agnew, Koella & Michalakis, 2000). O manejo para conservação da fauna silvestre freqüentemente inclui introdução, retirada e translocação de animais, desconsiderando os parasitas destes, bem como as peculiaridades dessa interação.

Desafios e Dificuldades

Identificação Taxonômica

A diversidade de espécies dos roedores silvestres é ainda pouco conhecida e a sistemática apresenta-se, para muitos grupos, bastante confusa. O primeiro passo na utilização de animais silvestres é determinar seu *status* taxonômico correto, a fim de se evitar que animais de espécies diferentes sejam criados como espécie única.

No caso de roedores faz-se necessária a utilização de técnicas citogenéticas (cariotipagem), pois a identificação específica considerando-se somente os caracteres morfológicos e morfométricos nem sempre é possível. Tais procedimentos têm-se apresentado fundamentais para identificação mais precisa de várias espécies (Barros, Reig & Perez-Zapata, 1992; Bonvicino et al., 1996; Silva & Yonenaga-Yassuda, 1998).

Obtenção de Matrizes

Uma vez selecionada a espécie-alvo, é necessária a formação do plantel de matrizes reprodutoras que dará origem à colônia a partir de animais capturados no campo. A fim de preservar a heterogeneidade genética da colônia, deve-se viabilizar a captura de um plantel mínimo viável de ambos os sexos. Sugerem-se, ainda, coletas periódicas para reforço do plantel, evitando, desse modo, o envelhecimento da colônia e o conseqüente declínio do sucesso reprodutivo. Vale ressaltar que a homogeneidade genética pode levar à seleção de animais mais resistentes ou susceptíveis a determinado agente, mascarando, dessa forma, o fenômeno que ocorre na natureza.

Essa etapa do trabalho exigirá colaboração de mastozoólogos, dada a demanda de conhecimentos básicos de ecologia, biologia e distribuição geográfica da espécie-alvo, além de equipe especializada, infra-estrutura e material adequado para o trabalho de campo.

Quarentena

Após a captura no campo, os animais devem passar por um período de quarentena em recinto apropriado e separado das salas de criação. O período de quarentena permite um acompanhamento da saúde dos animais, a fim de se detectar alguma anormalidade ou alteração clínica, por meio de exames parasitológicos e sorológicos, que indiquem infecções preexistentes por microorganismos (incluindo bactérias, fungos, vírus, clamídias, riquétsias, microplasmas) e/ou parasitos (endo e ecto).

É importante ressaltar que algumas viroses podem ficar incubadas nos animais e só se manifestarem tardiamente. Infecções desse tipo poderiam levar à contaminação ou mesmo à extinção de toda uma colônia. O cuidado se estende também aos manipuladores dos animais e, até os resultados finais dos exames diagnósticos, todos os procedimentos com animais silvestres devem ser considerados potencialmente contaminantes e perigosos, requerendo, assim, procedimentos especiais de prevenção e biossegurança. Após o período de quarentena, o animal deve ser transportado até a área do biotério. Para roedores, é recomendado que o transporte seja feito nas suas próprias gaiolas de criação, observando-se os cuidados com segurança e ventilação.

Biossegurança na Quarentena

As informações que se seguem foram extraídas do *Manual de Procedimentos para a Manipulação de Microorganismos Patogênicos e/ou Recombinantes na Fiocruz* (CTBio/Fiocruz, 1998).

A biossegurança na quarentena deve ser encarada como a etapa mais importante do trabalho. Existem quatro níveis de biossegurança: NB-1, NB-2, NB-3 e NB-4, crescentes no maior grau de contenção e complexidade do nível de proteção. O nível de biossegurança de um experimento será determinado segundo o organismo de maior classe de risco envolvido no experimento. Em virtude, principalmente, do risco de infecção por hantavírus, recomenda-se a construção de uma quarentena com nível se biossegurança NB-3. Esse nível permite procedimentos com exposição a microorganismos que geralmente causam doenças em seres humanos ou em animais e podem representar um risco se disseminados na comunidade.

O hantavírus é um vírus pertencente à família Bunyaviridae e seu potencial zoonótico o classifica como o agente mais perigoso transmitido por roedores. Os hantavírus são transmitidos aos humanos através da aerolização de excretas de roedores e, recentemente, foi descrita também a transmissão inter-humana. No velho continente, os hantavírus são agentes etiológicos da febre hemorrágica com síndrome renal e nefropatia epidêmica e, nas Américas, da síndrome pulmonar por hantavírus. Após a primeira descrição da síndrome pulmonar, em 1993, diversos casos vêm sendo descritos em diferentes regiões com letalidade superior a 50%. Não há vacinas, entretanto a terapia antiviral com ribavirina pode reduzir a letalidade quando feita precocemente. O cuidado deve ser redobrado durante coletas de sangue e necropsia dos roedores.

Para todos os procedimentos, o uso de equipamentos de proteção individual, tais como jalecos de manga comprida, luvas e máscara, são indispensáveis. Esses equipamentos devem ser distribuídos gratuitamente, cabendo aos trabalhadores utilizá-los e conservá-los.

Para procedimentos de eutanásia recomenda-se a utilização de gelo seco, que deve ser colocado em um recipiente fechado junto ao animal. Os animais mortos e a maravalha usada são considerados resíduos sólidos de risco biológico potencialmente contaminados e devem ter como destino a incineração (ABNT, 1987). Antes de serem incinerados, a maravalha deve ser ensacada e autoclavada, bem como os animais mortos e os materiais de maior volume. As caixas devem ser imersas em água sanitária por pelo menos quatro horas, lavadas com detergente e banhadas em solução de hipoclorito de sódio a 1%.

Caso não seja viável a autoclave, faz-se a descontaminação química. Nesse caso, deve-se imergir todo o animal, com todos os seus órgãos e membros, em solução desinfetante; deixar um mínimo de 2 horas para, então, incinerá-lo.

Em caso de acidentes importantes, comunicar ao órgão responsável de cada instituição e procurar o posto de saúde mais próximo, por mais simples que possa parecer o acidente (por exemplo, mordidas e arranhões).

Implantação e Manutenção da Colônia

As condições do biotério de roedores silvestres não necessitam seguir a mesma rigidez de normas de biossegurança empregadas na quarentena, uma vez que somente animais não-infectados serão incorporados à colônia. Alguns pontos, entretanto, devem ser ressaltados, tais como:

· assegurar-se de que todos os que têm contato com esses animais e seus descartes estejam familiarizados com os procedimentos e cuidados necessários. Quando possível, os indivíduos que trabalham com animais de experimentação devem receber imunização com as vacinas apropriadas;
· acondicionar animais em caixas com tampas, certificando-se de que não há espaço para fugas;
· sacrificar roedores encontrados fora das caixas, autoclavando e incinerando suas carcaças. Na eventualidade de o animal fugir do laboratório, as autoridades devem ser notificadas prontamente.

As condições ambientais do biotério devem ser estabilizadas e monitoradas, considerando-se exaustão, refrigeração, iluminação e desumidificação do ar. A adaptação ao cativeiro e a manutenção do roedor silvestre saudável requerem estudos sobre as melhores condições de alojamento (tamanho e tipo de caixa, gaiola ou cama e controle do fotoperíodo) e dieta adequada para cada espécie.

O controle do fotoperíodo é de extrema importância, pois pode influenciar o ciclo reprodutivo do roedor. Muitas espécies apresentam em seu hábitat natural reprodução estacional e controlada pelo padrão de luminosidade (Hasbrouck, Servello & Kirkpatrick, 1986), sendo necessário reproduzir-se em cativeiro esse padrão luminoso, para se obter reprodução ao longo do ano. Quanto à dieta, podemos constatar que, apesar de cada espécie ter hábitos alimentares específicos na natureza (frugívoros, granívoros, insetívoros e até onívoros), a ração padrão balanceada para roedores de laboratório tem-se mostrado eficiente para suprir as necessidades nutricionais desses animais. Como cama, o uso de maravalha também vem sendo adotado com sucesso.

Estabelecidas as condições de manutenção da colônia, o próximo passo será tentar a reprodução da espécie em condições de laboratório evitando-se, sempre que possível, a consangüinidade. Os parâmetros da biologia reprodutiva de quase todas as espécies de pequenos mamíferos silvestres são completamente desconhecidos. A determinação de informações básicas como idade na maturação sexual, época reprodutiva, tempo de gestação, tamanho da ninhada, crescimento e longevidade, será o desafio anterior à produção de animais para experimentação (Roberts, Thompson & Cranford, 1988; Hodara et al., 1989; D'Andrea, Cerqueira & Hingst, 1994; D'Andrea et al., 1996; Hingst, D'Andrea & Cerqueira, 1998).

Os testes sorológicos e parasitológicos devem ser realizados periodicamente para avaliação das condições sanitárias do biotério. Além disso, a avaliação clínica e comportamental dos animais é imprescindível para a manutenção da saúde dos mesmos e da colônia.

A fim de se atender às normas para criadouros científicos, segundo Portaria nº 016, de 4 de março de 1994, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), todos os animais devem ser identificados por *microchips* e, após a morte, os animais provenientes do campo devem ser taxidermizados, seu esqueleto preparado, e depositados em uma coleção científica.

Produção de Animais

A utilização experimental de qualquer espécie exige a produção regular de animais. Para obter-se sucesso na reprodução, um aspecto importante é a eliminação das possíveis fontes de estresse, principalmente se considerarmos as maiores exigências para a adaptação de animais silvestres ao novo ambiente. Os ruídos são de grande importância no estresse animal, causado muitas vezes em razão das diferenças na faixa de sensibilidade auditiva de homens e roedores. As principais fontes de ruídos em biotérios são as atividades de rotina (operações de alimentação e limpeza), o barulho de portas e de equipamentos. Ruídos agudos ou estridentes são particularmente mais estressantes para os animais por causa de sua alta freqüência (Merusse & Lapichik, 1996).

O animal estressado permanece inquieto, agressivo, não se reproduz, promove movimentos estereotipados, podendo, inclusive, se automutilar. Os resultados obtidos nos experimentos certamente não serão satisfatórios nessas condições.

O planejamento de produção e criação de animais silvestres deve ser individualizado para cada espécie e até mesmo para animais de uma mesma espécie provenientes de diferentes localidades. A baixa produtividade, sazonalidade da reprodução e peculiaridades da estratégia de vida das espécies são fatores complicadores na produção regular de filhotes. O pesquisador deve ter consciência dessas dificuldades e adaptar o seu experimento para a provável utilização de amostras pouco numerosas.

Colônias auto-sustentáveis são possíveis, desde que tomados os cuidados citados anteriormente, como evitar a homozigose, estresse, a seleção de indivíduos resistentes ou susceptíveis, entre outros.

Pessoal Especializado

O gerenciamento da colônia e a manipulação de animais recém-introduzidos ao cativeiro dependem de treinamento específico de bioteristas nem sempre preparados para essa missão. O baixo nível de formação do pessoal técnico disponível na maioria das instituições públicas brasileiras, como universidades e centros de pesquisa, que utilizam experimentação animal é mais um fator complicador. Apesar do interesse crescente na utilização desses modelos, há uma carência na união de esforços para a solução de problemas comuns, troca de informações e padronização de métodos. Na maioria dos casos, especialistas em áreas diversas, motivados pela necessidade, atuam como bioteristas improvisados e de maneira precária obtêm animais para sua experimentação. Cursos específicos de criação de animais silvestres são imprescindíveis para a formação de um bom profissional. É importante, também, manter a participação e a informação entre todas as pessoas ligadas ao experimento, como pesquisadores, estagiários e outros técnicos.

Experiências Bem-Sucedidas

Algumas espécies da fauna brasileira têm sido utilizadas como modelos experimentais alternativos para estudos diversos. Podemos destacar os marsupiais *Didelphis, Philander* e *Monodelphis* e os roedores *Nectomys, Calomys, Akodon* e *Thrichomys*, como os mais citados (D'Andrea, Cerqueira & Hingst, 1994; De Villafañe, 1981; Mello & Mathias, 1987; Roberts, Thompson & Cranford, 1988; Perissé, Fonseca & Cerqueira, 1989; Horta & D'Andrea, 1994; Green, Krause & Newgrain, 1996; Gonzalez & Claramunt, 2000).

Referências Bibliográficas

Agnew, P.; Koella, J. C. & Michalakis, Y. Host life history responses to parasitism. *Microbes and Infection*, 2:891-896, 2000.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Resíduos sólidos NBR-1004, 1987.

Barros, M. A.; Reig, O. A. & Perez-Zapata, A. Cytogenetics and karyosystematics of South American oryzomyine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae) – IV. Karyotypes of Venezuelan, Trinidadian, and argetinian water rats of the genus *Nectomys*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 59:34-38, 1992.

Bastos, O. C. et al. *Holochilus brasiliensis nanus* Thomas, 1897. Sugestão de modelo experimental para filariose, leishmaniose e esquistossomose. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 26:307-315, 1984.

Bonvicino, C. R. et al. The Chromosomes of *Nectomys* (Rodentia: Cricetidae) with 2n=52, 2n=56, and interspecific Hybrids (2n=54). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 73:190-193, 1996.

Cordeiro, F.; Sulzer, C. R. & Ramos, A. A. Two new leptospiral serovars in the Javanica group isolated in Brazil. *Revista de Microbiologia*, 12:55-60, 1981.

Comissão Técnica de Biossegurança/Fundação Oswaldo Cruz (CTBio/Fiocruz). *Procedimentos para a Manipulação de Microorganismos Patogênicos e/ou Recombinantes na Fiocruz*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/Fundação Oswaldo Cruz, 1998.

D'Andrea, P. S.; Cerqueira, R. & Hingst, E. D. Age estimation of the Gray Four Eyed Opossum, *Philander opossum* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Mammalia*, 58:283-291, 1994.

D'Andrea, P. S.; Gentile, R & Cerqueira, R. Ecology of small mammals in a Brazilian rural area. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16:611-620, 1999.

D'Andrea, P. S. et al. Breeding of the water rat (*Nectomys squamipes*) in the laboratory. *Laboratory Animals*, 30:369-376, 1996.

D'Andrea P. S. et al. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea: Trematoda) in a naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) in Brazil. *Parasitology*, 120:573-582, 2000.

Daszak, P.; Cunningham A. A. & Hyatt, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. *Science*, 287:443-448, 2000.

Daszak P.; Cunningham, A. A. & Hyatt, A. D. Anthropogenic enviromental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, 78:103-116, 2001.

Deane, M. P.; Lenzi, H. L. & Jansen, A. M. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79:513-515, 1984.

Deem, S. L. et al. Conservation Medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916:370-377, 2000.

De Villafañe, G. Reproducción y crescimiento de *Calomys musculinus murillus* (Thomas, 1916). *Historia Natural*, 1:237-256, 1981.

Fayer, R. Global change and emerging infectious diseases. *Journal of Parasitology*, 86:1174-1181, 2000.

Gentile, R. et al. Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. *Studies on Neotropical fauna and environment*, 35:1-9, 2000.

Gonzalez, E. M. & Claramunt, S. Behaviors of captive short-tailed opossums, *Monodelphis dimidiata* (Wagner, 1847) (Didelphimorphia: Didelphidae). *Mammalia*, 64:271-285, 2000.

Green, B.; Krause, W. J. & Newgrain, K. Milk composition in the North American opossum (*Didelphis virginiana*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 113:619-623, 1996.

Grenfell, B. T. & Gulland, F. M. D. Introduction: Ecological impact of parasitism on wildlife host populations. *Parasitology*, 111:3-14, 1995.

Hasbrouck, J. J.; Servello, F. A. & Kirkpatrick, R. L. Influence of photoperiod and nutrition on pine vole reproduction. *American Midland Naturalist*, 116:246-255, 1986.

Hingst, E. D.; D'Andrea, P. S. & Cerqueira, R. Breeding of *Philander opossum* (Didelphimorphia: Didelphidae) in captivity. *Laboratory Animals*, 32:434-438, 1998.

Hodara, V. L. et al. *Calomys laucha* (Rodentia: Cricetidae): growth and breeding in laboratory conditions. *Laboratory Animals*, 89:340-344, 1989.

Horta, C. & D'Andrea, P. S. Técnicas de acasalamento de *Nectomys squamipes* (Rodentia: Cricetidae). *Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Mastozoologia*, 26:4-5, 1994.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (Ibama). Portaria n.16, 4 mar. 1994. *Diário Oficial da União*, p.3448-3449, 10 mar. 1994. Seção I.

Jansen, A. M. et al. *Trypanosoma cruzi* in *Didelphis marsupialis*: an parasitological and serological follow up of the acute phase. *Experimental Parasitology*, 73:249-259, 1991.

Jansen, A. M. et al. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: a study on the correlations and kinetics of the systemic and scent glands infection in naturally and experimentally infected animals. *Experimental Parasitology*, 86:37-44, 1997.

Koella, J. C.; Agnew, P. & Michalakis, Y. Coevolutionary interactions between host life histories and parasite life cycles. *Parasitology*, 116:47-55, 1998.

Machado e Silva, J. R. et al. Roedores silvestres como modelos experimentais da esquistossomose mansônica: *Akodon arviculoides* (Rodentia: Cricetidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *33*(4):257-261, 1991.

Maldonado Jr., A. et al. Evaluation of the resistance to *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Cricetidae), a natural host of infection in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 36:193-198, 1994.

Mello, D. A. & Mathias, C. H. Criação de *Akodon arviculoides* (Rodentia: Cricetidae) em laboratório. *Revista Brasileira de Biologia*, 47:419-423, 1987.

Merusse, J. L. B. & Lapichik, V. B. V. Instalações e equipamentos. In: De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Motta, D. M. F. *Estudo do desenvolvimento extra-uterino de* Didelphis aurita *Wied, 1826 em cativeiro – investigação de critérios para a estimativa da idade*, 1988. M. Sc. Thesis, Rio de Janeiro: Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Périssé, M.; Fonseca, C. R. S. D. & Cerqueira, R. Diet determination for small laboratory-housed wild mammals. *Canadian Journal of Zoology*, 67:775-778, 1989.

Pinho, A. P. et al. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94: 509-514, 2000.

Ribeiro, A. C. et al. Susceptibility of *Nectomys rattus* (Pelzen, 1883) to experimental infection with *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907): an potential reservoir in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93:295-299, 1998.

Roberts, M. S.; Thompson, K. V. & Cranford, J. A. Reproduction and growth in captive punare *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae) of the Brazilian Caatinga with reference to the reproductive strategies of the Echimyidae. *Journal of Mammalogy*, 69:542-551, 1988.

Rodrigues e Silva, R. et al. Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni* – parasitological aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87:271-276, 1992.

Scott, M. E. & Lewis, J. W. Populations dynamics of helminth parasites in wild and laboratory rodents. *Mammal Rev.*, 17:95-103, 1987.

Silva, M. J. J. & Yonenaga-Yassuda, Y. Karyotipe and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 81:46-50, 1998.

Souza, V. A. M. et al. *Nectomys squamipes* (Rodentia: Cricetidae) as an experimental model for Schistosomiasis mansoni. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87:277-280, 1992.

Spear, J. R. Conservation Medicine: the changing view of biodiversity. *Conservation Biology*, 14:1913-1917, 2000.

Thomas, F. et al. Parasites and host life-history traits: implications for community ecology and species co-existence. *International Journal for Parasitology*, 30:669-674, 2000.

lternativas para Animais de Laboratório: do animal ao computador

Octavio Augusto França Presgrave

Introdução

Embora as manifestações em defesa dos animais de laboratório e contra sua utilização em experimentos tenham crescido nos últimos anos e tomado mais espaço na mídia, essa idéia é muito mais antiga do que se imagina. Em 1760, Fergusson já demonstrava preocupação com os métodos bárbaros em testes animais. No século XIX, Jeremy Benthan lançou a máxima "a questão não é se os animais raciocinam, ou se eles podem falar, mas se eles sofrem".

A primeira tentativa de propor um código de ética na prática da pesquisa partiu do inglês Marshall Hall, também no século XIX. Nesse código, ele propôs que a dor imposta aos animais fosse diminuída, além de fazer alusão à substituição dos grandes animais por animais inferiores na escala zoológica. Também fazia referência à necessidade de se evitar repetições desnecessárias para a obtenção de resultados.

Em 1842, foi fundada o que podemos chamar de primeira sociedade protetora dos animais, a British Society for the Prevention of Cruelty to Animals (Sociedade Britânica para a Prevenção da Crueldade aos Animais), mais tarde chamada de Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals. Mas foi em 1959, com a publicação do livro *Principles of Humane Experimental Technique* (Princípios da Técnica Experimental Humana), que Russel e Burch lançaram o conceito dos 3Rs – *Replacement, Reduction and Refinement* (Substituição, Redução e Refinamento). Cabe ressaltar que, sem desmerecer o trabalho desses dois cientistas, tais idéias já estavam contidas na idéia do código proposto por Hall. Russel e Burch, certamente, clarificaram esses conceitos de forma que os mesmos se tornaram mais populares e disseminados no meio científico.

Em 1978, defensores europeus dos direitos dos animais iniciaram a campanha para a retirada do método de irritação ocular em produtos cosméticos. Esse método foi descrito por Draize, em 1944, e sofreu diversas alterações ao longo dos anos; entretanto, continua sendo utilizado oficialmente por diversos órgãos oficiais, bem como pelas indústrias no desenvolvimento de novas fórmulas de forma a avaliar a segurança de seus produtos.

Experimentação Animal

Antes de falarmos sobre as alternativas, vale a pena recordar alguns conceitos sobre a experimentação animal, que auxiliam, até certo modo, na compreensão e estruturação de uma metodologia alternativa.

As metodologias farmacológica e toxicológica (a experimentação animal, propriamente dita) se baseiam na observação dos efeitos de substâncias sobre organismos vivos, para a qual o experimentador se vale de técnicas fisiológicas ou bioquímicas. Por meio dessas observações, podem ser obtidos dados qualitativos ou quantitativos sobre a ação de medicamentos ou substâncias.

De forma geral, qualquer animal pode ser utilizado em experimentação; entretanto, procura-se um modelo específico para cada ação estudada. Como exemplo, podemos citar o uso do gato para estudos do sistema circulatório, a utilização do cão como modelo para estudo geniturinário e os pequenos roedores, para avaliações do sistema respiratório, entre outros.

A experimentação animal já constava descrita no *Corpus Hipocraticum* (c. 350 a.C.). Nele eram citados experimentos com porcos. Muitos outros fatos tiveram importante contribuição para o desenvolvimento dos ensaios biológicos. Entre os quais, podemos destacar a padronização da antitoxina diftérica por Erlich (fim do século XIX), a padronização da insulina (década de 20) e a mudança no conceito de unidade, com a introdução da preparação-padrão.

Outro fato importante, que muito contribui para o refinamento dos experimentos, é a introdução de métodos estatísticos, os quais fizeram com que se estabelecesse o nível de significância de um resultado, o que permitiu a extrapolação de dados de uma pequena amostra para uma população, indicando, ainda, a probabilidade de ocorrência desse fenômeno.

Tais fatos, em conjunto com outros, contribuíram e continuam contribuindo para a racionalização no uso de animais de laboratório.

Independentemente de estarmos trabalhando com animais ou células, a estrutura de um ensaio biológico se baseia em três pilares fundamentais: o estímulo, o substrato e a resposta.

O estímulo é a substância ou o produto que será administrado ao substrato, seja ele um animal, seja uma célula. Esse conjunto irá fornecer a resposta que pode ser, por exemplo, aumento de pressão arterial ou morte celular.

Métodos Alternativos

Métodos alternativos são procedimentos que podem substituir o uso de animais em experimentos, reduzir o número de animais necessários, ou refinar a metodologia de forma a diminuir a dor ou o desconforto sofrido pelos animais.

São alguns exemplos de substituição no uso de animais:

Uso de informação obtida no passado – em virtude da coleta de dados históricos em experimentação animal ou mesmo de ocorrências em seres humanos, determinados experimentos podem não ter necessidade de serem repetidos.

Uso de técnicas físico-químicas – com o aumento do conhecimento na área química, bem como por meio do desenvolvimento de métodos e equipamentos sofisticados, algumas substâncias que só antigamente poderiam ser testadas em animais podem ser ensaiadas por métodos químicos ou físico-químicos. Um dos exemplos a citar refere-se ao ensaio de potência de insulina. Anteriormente, três métodos eram utilizados: glicemia em camundongos, glicemia em coelhos ou convulsão em camundongos. Hoje em dia, para produtos acabados (para matéria-prima ainda se utiliza um dos métodos em animais), já se pode utilizar a determinação da potência por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução).

Uso de modelos matemáticos ou computacionais – recurso em que se utiliza um banco de dados que pode predizer determinadas ações de substâncias no organismo. O banco é formado por meio de informações obtidas no passado. Esse assunto será melhor abordado no item Sistemas Técnicos para a Predição de Toxicidade.

Uso de organismos inferiores não classificados como animais protegidos – não deixa de ser algo polêmico, pois, quando pensamos sobre o prisma ético, ser vivo é ser vivo em qualquer situação, não importando se ele é um inseto ou um macaco. Entretanto, a utilização de larvas de camarão (*Artemia salina*)

ou o uso de pulga d'água (*Daphnia pulgans*) são considerados como possibilidades de substituição ao uso de animais de laboratório. Em geral, esses invertebrados são muito utilizados em experimentos de ecotoxicologia, mas alguns trabalhos apresentam a sua utilização como proposta de alternativas ao teste de irritação em coelhos.

Uso de estágios iniciais do desenvolvimento de espécies animais protegidas – é o caso, por exemplo, do teste da HET-CAM (membrana cório-alantóide de ovo de galinha embrionado), no qual se utiliza o ovo embrionado aos 9 dias, tempo este em que não há o desenvolvimento do sistema nervoso do embrião, o que, teoricamente, não causaria a ele dor ou sofrimento. Tal ensaio tem sido apontado como um bom substituto ao teste de irritação ocular em coelhos.

Uso de sistemas *in vitro* – o sistema *in vitro*, como veremos adiante, pode ser considerado como uma substituição total ou parcial, sendo algumas vezes também classificado como uma redução.

Vigilância pós-mercado e estudos epidemiológicos – os dados obtidos nessas situações irão compor o conjunto de informações, que poderão subsidiar os bancos de dados, e as demais, que poderão ser utilizadas para se evitar a experimentação em animais.

Uso de voluntários humanos – outra questão polêmica que deve ser encarada com muito cuidado. É importante frisar que a utilização de humanos não se destina a estudar a toxicidade, mas, sim, a demonstrar a ausência da mesma. Isso quer dizer que não se deve utilizar seres humanos em estudos de toxicidade de produtos ou substâncias – somente depois que estas já passaram por toda uma bateria de testes, envolvendo os métodos *in vitro* e os testes em animais, cujos resultados já foram negativos. Dessa forma, a utilização de seres humanos já parte do pressuposto de que as possibilidades de toxicidade são mínimas e a sua utilização se faz necessária para a demonstração de ausência de efeitos tóxicos. Cabe ressaltar a necessidade de uma ampla discussão ética quando da utilização de seres humanos em experimentação.

Algumas classificações didáticas podem ser utilizadas para um melhor entendimento do conceito dos 3Rs. Por exemplo, a substituição pode ser direta ou indireta, total ou parcial.

Substituição direta – é aquela em que se utiliza um sistema visando fornecer respostas o mais próximo possível do modelo animal. Por exemplo: pele *in vitro* de animais ou voluntários humanos. Na realidade, existem diversas formas de obter essa pele *in vitro*, mas, de qualquer forma, o objetivo é, dentro desse sistema, obter um resultado muito próximo ou igual ao que se teria fazendo um ensaio de irritação cutânea em coelhos.

Substituição indireta – nela se utiliza um sistema que fornece um resultado, não por ação no mesmo substrato, mas, sim, por dosagem ou reação de algum mediador que produz a resposta no sistema *in vivo*. Por exemplo: o teste de LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) substitui o ensaio de pirogênio em coelhos pela determinação qualitativa ou quantitativa da presença de endotoxinas numa solução. Em animais, essa presença se manifesta pela ocorrência de febre; no caso do método *in vitro*, o fenômeno é medido de forma indireta (ou seja, se há endotoxina em uma determinada quantidade, o efeito nos animais seria a febre).

Substituição total – é aquela em que a informação necessária pode ser obtida sem o uso de animais de experimentação. Por exemplo: potência de insulina ou somatotropina por HPLC. Nesse caso, os animais são substituídos pela determinação da potência por métodos físico-químicos. Outro exemplo é a produção de anticorpos monoclonais em sistemas *in vitro*.

Substituição parcial – é aquela em que se substitui, parcialmente, a utilização de animais. Por exemplo: técnicas que utilizam cultura de células, órgãos isolados ou uso de preparações subcelulares (receptores isolados).

Pode-se notar que alguns conceitos se confundem entre si. Na realidade, essa divisão é muito mais didática do que outra coisa. Um exemplo disso é o conceito que trata do cultivo celular. Se a célula for de origem humana (por exemplo, um carcinoma), podemos interpretar como uma substituição total, mesmo

sendo uma célula de linhagem; se for de origem animal, é certo que para a sua obtenção foram utilizados vários animais, por mais que essas células sejam utilizadas e fornecidas por muito tempo, mas alguma vez foi necessária a utilização de animais para a sua obtenção. Esse caso pode ser interpretado como substituição parcial ou mesmo uma redução.

O mesmo raciocínio vale para o caso dos órgãos isolados, uma técnica muito utilizada em farmacologia. Por exemplo, a técnica de íleo isolado. Uma cobaia é sacrificada e com o fragmento de íleo que é retirado podem ser feitos vários experimentos. Pode-se, dentro desse raciocínio, considerar essa técnica como uma redução, já que se utilizam vários fragmentos de um único animal, e, conseqüentemente, vários experimentos, em vez de vários animais. Entretanto, a técnica pode ser entendida como substituição, uma vez que se utiliza uma parte de um animal para se estudar um fenômeno, não em vários animais inteiros, mas em partes do animal.

Como se pode observar, devemos nos deter na filosofia do princípio dos 3Rs sem nos preocupar com as divisões teóricas do mesmo.

Um dos progressos que os pesquisadores vêm alcançando na área da redução consiste no procedimento de *screening*, no qual a integração de ensaios *in vitro* com sistemas computacionais e a hierarquização de métodos podem fazer com que não exista a necessidade de se utilizar animais, pois, se no decorrer desse procedimento algum indício de toxicidade for verificado, os animais não são utilizados.

Um exemplo de hierarquização pode ser, antes de se passar a fazer a experimentação em animais, o de verificar a medida de pH da substância ou produto; dependendo da faixa em que este se encontra (abaixo de 2,0 ou acima de 11,5) já pode ser considerado como corrosivo. Neste caso, interrompe-se o procedimento, do contrário pode-se seguir a aplicação. Outro exemplo, admitindo se ter chegado ao uso de animais, é fazer primeiramente o teste de irritação cutânea para, caso esta seja negativa, em seguida, fazer o teste de irritação ocular, caso contrário, este não deve ser realizado.

O refinamento é obtido por meio do uso de anestésicos (quando estes não interferem nos resultados experimentais) pela melhoria do desenho experimental e, conseqüentemente, pela utilização de métodos estatísticos que configuram uma melhor confiabilidade nos resultados.

Expert Systems – Sistemas Técnicos para Predição de Toxicidade

Um sistema técnico para a predição de toxicidade é considerado como sendo qualquer sistema formal, não necessariamente computacional, que permite que um usuário obtenha predição racional sobre a toxicidade de substâncias químicas. Todos os sistemas técnicos são construídos sobre dados experimentais representando uma ou mais manifestações tóxicas de substâncias em sistemas biológicos (banco de dados) e/ou regras derivadas desses dados.

Exemplos de sistemas técnicos:

- QSAR – *Quantitative Structure-Activity Relationship*
- PBPK – *Phisiologically Based Pharmaco-Kinetic*
- Derek – *Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge*
- Compact – *Computer-Optimised Molecular Parametric Analysis of Chemical Toxicity*
- Topkat – *Toxicity Prediction by Computer Assisted Technology*
- *Harzardexpert*
- *Metaboloexpert*
- *OncoLogic*
- StAR – *Standardised Argument Report*

Cada um desses sistemas se destina a um fim específico. Os mais conhecidos são o QSAR e o PBPK. O primeiro prediz os efeitos tóxicos com base na comparação estrutura-atividade das substâncias, e o segundo prediz as ações farmacocinéticas (absorção, metabolismo, eliminação etc.).

A Busca Pelos Métodos Alternativos

Hoje em dia, buscamos alternativas tanto na área experimental quanto na educacional. Basicamente, em termos de ensino, a experimentação animal já pode ser substituída, praticamente, sem causar prejuízos muito sérios ao aprendizado.

Na área de educação veterinária, já contamos com diversos modelos para o ensino e o treinamento de cirurgias, suturas e demais procedimentos. São modelos de cães e gatos, de diversos tamanhos, simulando, inclusive, respiração e outros parâmetros fisiológicos. Muitas pessoas combatem esse tipo de técnica, afirmando que elas não reproduzem inteiramente os aspectos e as condições encontrados na utilização de um animal verdadeiro. Realmente nada se compara ao organismo real, entretanto, o aprendizado nesses modelos nos fornece uma boa visão dos procedimentos e técnicas, possibilitando uma segurança maior quando diante de uma situação real. Cabe ressaltar que a utilização de bonecos já é prática na medicina humana e em treinamentos de primeiros socorros, simulando diversos tipos de queimaduras, forma correta de respiração artificial etc.

No treinamento em técnicas de experimentação animal existe um modelo de rato em silicone, no qual se pode treinar administração oral, intravenosa e intraperitoneal, simulando a textura e a resistência normais, além de apresentar tubos na cauda, simulando veias, contendo um líquido mimetizando sangue.

Um outro recurso, muito utilizado na área da farmacologia, são os simuladores em CD-ROM. Com eles, podemos 'administrar' diversos agonistas e antagonistas e visualizar seus efeitos em diversos parâmetros fisiológicos, tais como respiração ou pressão arterial.

Hoje em dia, existem alguns vídeos que detalham métodos de vias de administração, cirurgia, anestesia, enfim, diversos exemplos de manejo e experimentação animal.

Na área experimental, muitos ensaios têm sido propostos. Alguns deles já estão em estágio avançado de validação, enquanto outros estão ainda sendo muito estudados para se verificar as possibilidades de substituir ou reduzir o uso de animais em experimentação.

Alguns exemplos de técnicas alternativas:

- LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) – substitui o ensaio de pirogênio em coelhos. Baseia-se na reação entre a endotoxina e substrato LAL. Dependendo do método, a presença de endotoxina pode ser constatada por meio da coagulação (método gel-clot) ou da liberação de cor (método cromogênico).
- HET-CAM (membrana cório-alantóide de embrião de galinha) – forte candidato para a substituição do teste de irritação ocular e de mucosas. Baseia-se na alteração dos vasos da membrana cório-alantóide, por meio da observação do tempo do surgimento de congestão, hemorragia e coagulação.
- Citotoxicidade – compreende diversas técnicas usando parâmetros de morte ou alterações fisiológicas de diferentes linhagens celulares. Entre os métodos mais utilizados, estão a difusão em agarose (células L929), captação de vermelho neutro ou MTT – (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium), ambos utilizando células 3T3 ou Sirc.
- Pele reconstituída – utilização de fragmentos de pele humana (a partir de circuncisão ou sobras de cirurgia plástica). Observação de alterações histológicas e/ou liberação de mediadores inflamatórios.
- RBC (*Red Blood Cell Assay*) – baseia-se na avaliação da hemólise e na desnaturação causadas por produtos (cosméticos) e/ou substâncias (tensoativos) perante um controle conhecido, geralmente, Lauril Sulfato de Sódio.

- WBC (*Whole Blood Assay*) – possível substituto para o ensaio de detecção de pirogênio em coelhos, por meio da liberação de mediadores inflamatórios quando um produto injetável é colocado em contato com sangue total humano.
- Kits comerciais – Corrositexâ, Skintexâ, Eyetexâ, Episkinâ, entre outros, são exemplos de kits utilizados para determinar grau de corrosão, potencial de irritação cutânea ou ocular.

Presente e Futuro

Conforme já dito, esses métodos se encontram em distintos estágios de desenvolvimento e validação. Esse processo é bastante árduo, podendo atingir 10 anos ou mais. Qualquer método, para ser validado, tem de passar por estudos colaborativos, realizados por vários laboratórios, em que são analisadas as variações inter e intralaboratoriais.

Não podemos pensar que seja possível a substituição de todos os ensaios que utilizam animais. Por exemplo, experimentos que envolvem aprendizagem e memória ainda não apresentam propostas de substituição, o que não quer dizer que daqui a 10, 20 ou 50 anos isso não seja possível. O avanço do conhecimento científico humano e o desenvolvimento de métodos imunológicos, químicos e genômicos poderão contribuir muito para o futuro dos métodos alternativos.

É importante ressaltar que não cabem discussões por parte de protecionistas e cientistas sobre quem tem razão em sua forma de pensar, ou seja, se deve-se parar com os experimentos ou continuar. É necessário que ambas as partes se juntem e discutam seus pontos de vista e possibilidades de estudos. É preciso que cada um compreenda e respeite o prisma com que o outro olha e entende o tema. Essas discussões têm de ocorrer sob atmosfera técnica e científica, jamais em clima fundamentalista ou radical. Até a década de 60, ninguém poderia imaginar que seria possível detectar pirogênio sem ser em coelhos; entretanto, em 1964, Levin e Bang descreveram o que seria a base do método de LAL e, hoje, já falamos em quantificar a liberação dos mediadores envolvidos na febre.

É importante entender que não devemos deixar de usar os animais somente porque assim queremos, sem que estejamos certos de que os ensaios utilizados nessa substituição refletem os efeitos que realmente estamos estudando. Devemos ter certeza de que o método alternativo é suficientemente capaz de indicar, o mais precisamente possível, as condições de eficácia e segurança de uma substância ou produto. Devemos ter a consciência de que podemos substituir o uso de animais em alguns experimentos, desde que as alternativas estejam bem definidas e validadas. Assim, temos a obrigação de continuar a estudar e a desenvolver métodos visando a substituições futuras.

Bibliografia

Archer, G. et al. The validation of toxicological prediction models. *Alternatives to Laboratory Animals*, 25(5):505-516, 1997.

Balls, M. Replacement *of animal procedures:* alternatives in research, education and testing. *Laboratory Animals*, 28:193-211, 1994.

Balls, M. Reducing animal testing: tests matter more than what is tested. *Alternatives to Laboratory Animals*, 25(6):613-617, 1997.

BALLS, M. & FENTEM, J. Progress toward the validation of alternative tests. *Alternatives to Laboratory Animals*, 25(1):33-43, 1997.

BALLS, M. & FENTEM, J. Non-animal alternatives and reduction in laboratory animal use. *Alternatives to Laboratory Animals*, 25(3):215-218, 1997.

BALLS, M. et al. The three Rs: the way forward. *Alternatives to Laboratory Animals*, 23:838-866, 1995.

CASTEL, J. V. & GÓMEZ-LECHÓN, M. J. In vitro *Methods in Pharmaceutical Research*. San Diego: Academic Press, 1997.

CURREN, R. D. & HARBELL, J. W. In vitro alternatives for ocular irritation. *Environmental Health Perspectives*, 106(suppl. 2):485-492, 1998.

DEARDEN, J. C. The development and validation of expert systems for predicting toxicity. *Alternatives to Laboratory Animals*, 25(3):223-252, 1997.

DE TORRES, E. P.; LARRAURI, A. G. & KUHN, G. R. Ensayos alternativos a la experimentación animal. *Animales de Experimentación*, 3(2):30-36, 1997.

FESTING, M. F. W. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Laboratory Animals*, 28(3):212-221, 1994.

FLECKNELL, P. A. Refinement of animal use – assessment and alleviation of pain and distress. *Laboratory Animals*, 28(3):222-231, 1994.

HARTUNG, T. & SPIELMANN, H. Der lange Weg zur validierten Ersatzmethode. *Alternatives in Exeprimentation*, 12(2):98-103, 1995.

HARTUNG, T. et al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. *Alternatives to Laboratory Animals*, 29:99-123, 2001.

KIMBER, I. et al. Alternative approaches to the identification and characterization of chemical allergens. *Toxicology* in vitro, 15:307-312, 2001.

MAJMUDAR, G. & SMITH, M. *In vitro* screening techniques in dermatology. *Cosmetics & Toiletries*, 113(4):69-113, 1998.

OSBORNE, R. & PERKINS, M. A. An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. *Food and Chemical Toxicology*, 32(2):133-142, 1994.

SPIELMANN, H. & LIEBSCH, M. Lessons learned from validation of *in vitro* toxicity test: from failure to acceptance into regulatory practice. *Toxicology* in vitro, 15:585-590, 2001.

RYAN, C. A.; HULETTE, B. C. & GERBERICK, G. F. Approaches for the development of cell-based *in vitro* methods for contact sensitization. *Toxicology* in vitro, 15:43-55, 2001.

VAN ZUPTEN, L. F. M. & VAN DER VALK, J. B. F. Developments on the implementation of the three Rs in research and education. *Toxicology* in vitro, 15:591-595, 2001.

WORTH, A. P.; BARRAT, M. D. & HOUSTON, J. B. The validation of computational prediction techniques. *Alternatives to Laboratory Animals*, 26(2):241-247, 1998.

Saúde e Bem-Estar Social

Marcos Antônio Pereira Marques

Introdução

É mais fácil sentir do que definir saúde. Autores e organizações científicas têm procurado fazê-lo das maneiras mais diversas. A carta da Organização Mundial da Saúde (OMS), aprovada em 1948, diz que "a saúde é um estado de completo bem-estar físico, mental e social e não apenas a ausência de doença ou enfermidade". A saúde pode ser considerada como a condição em que se encontra o organismo quando reage satisfatoriamente às exigências do meio, o que alarga o conceito a todos os seres vivos.

Em relação ao homem, pode-se considerar a saúde como a condição de bem-estar consciente em que se encontra o indivíduo em plena atividade fisiológica e psíquica, reagindo ao seu meio físico, biológico e social, sem dor, sem lesão, sem fadiga e sem tristeza.

Higiene

A higiene cuida da saúde, ensinando a protegê-la. Seu nome se originou da raiz grega *hygies*, que quer dizer sadio. Segundo a mitologia grega, higiene deriva de *Hygeia*, deusa grega que era tida como protetora da saúde e do bem-estar orgânico, exercendo a função de conselheira na preservação da saúde.

Posição Científica da Higiene

Pode-se dizer que, desde a mais remota antigüidade, o homem cuidou de sua própria saúde, preocupando-se apenas quando a doença apresentava sua sintomatologia. Os sacerdotes eram os disseminadores dos dogmas relativos à saúde, numa forma de medicina muito primitiva, utilizando-se de orações, exorcismos, conjurações e encantamentos, para expulsar o espírito do mal (causa da doença).

Com o passar do tempo, as descobertas sobre a fisiologia humana, os microorganismos e as doenças inspiraram, em meados do século XIX, a idéia de reunir os conhecimentos vantajosos para a conservação do homem e de sua saúde, tendo sido escolhido, para individualizar esses princípios, o termo higiene, já empregado por Galeno para caracterizar a conservação da saúde.

Desse modo, completou-se toda uma organização de princípios, corporificando o fundamento científico dos trabalhos que visam combater a causa e a disseminação das doenças transmissíveis, preparando os homens, por meio da medicina preventiva e da higiene, para lutar pela proteção da saúde, evitando, assim, a doença.

Higiene e Educação

Inicialmente, a ação da higiene era imposta por meio de leis, regulamentos e penalidades, causando, muitas vezes, a oposição popular (Revolta da Vacina no Rio de Janeiro – 1900).

Atualmente, a educação passou a ser o centro do esforço sanitário, esclarecendo toda a população, desde a mais tenra idade, por meio da divulgação e conscientização preventiva, sobre o significado e a importância de hábitos higiênicos.

Divisões da Higiene

Considerando-se a relação entre o indivíduo e o meio em que vive e a relação entre os vários indivíduos que formam a coletividade, a higiene pode ser estudada em três áreas básicas:

Ambiental – estuda o solo, a água, o ar e a habitação (saneamento básico);

Física ou individual – estuda a evolução do indivíduo, analisando as questões que se prendem aos cuidados corporais, ao vestuário, à alimentação e ao trabalho físico e mental;

Coletiva ou pública – estuda a população, visando à melhoria das condições especiais da vida urbana, rural e profissional no contexto da saúde pública.

Higiene e Bioterismo

Atualmente, o animal de laboratório é prioritário no campo da experimentação. Assim, os centros da criação desses animais têm grande preocupação com sua produção e manejo. A necessidade dos experimentos biomédicos e biotecnológicos impõe a produção e manutenção de animais com alto padrão sanitário e genético. Esse objetivo só é conseguido quando medidas de higiene são adotadas em todas as áreas do biotério, por meio das chamadas 'barreiras sanitárias'.

É importante salientar que, para as barreiras sanitárias atingirem seus objetivos, há toda uma equipe técnica, consciente de seus procedimentos operacionais, atuando nas áreas específicas do biotério, tais como sala de criação, área de desinfecção e higienização, controle da qualidade (laboratório de apoio).

Em razão da multiplicidade de tarefas desenvolvidas na reutilização de materiais que entrarão nas salas de criação, devemos estar mais atentos às áreas de desinfecção e higienização.

O bioterista responsável por essa área deverá ser treinado especificamente em processos de desinfecção e esterilização (físicos e químicos), além de ter conhecimentos específicos na área da higiene. Dessa forma, na contratação de profissionais para o biotério, deve ser levado em consideração o grau de escolaridade do candidato, bem como a observação de padrões higiênicos pessoais (unhas, cabelos, pele e vestimenta).

Higiene Individual

É o conjunto de métodos de limpeza e asseio adotados para preservar a saúde pessoal. As rotinas de higiene são estabelecidas visando à segurança do profissional e dos animais, cuja saúde depende da observação rígida das rotinas estabelecidas no uso de uniformes e equipamentos de proteção. É importante salientar:

Mãos – antes e depois de qualquer rotina ou atividade devem ser lavadas, visto que mãos e unhas são fonte de microorganismos. Deve-se usar sabão neutro e escova;

Pés – em biotérios, o trânsito em áreas com diferentes níveis sanitários deverá ser feito após a troca de calçados ou com uso de sapatilhas descartáveis. Pode-se utilizar o pedilúvio (bandeja com água e desinfetante) como auxílio no controle de microorganismos;

Boca e nariz – o uso de máscara previne a transmissão de agentes existentes no ar;

Banho – ao entrar no biotério, o funcionário deverá banhar-se antes do seu trabalho de rotina, seja em área limpa, área de desinfecção e esterilização ou de preparo de materiais. O banho tem por finalidade limpar a pele, eliminando a poeira do meio externo.

Higiene Ambiental

O propósito da limpeza é remover sujeiras da superfície e não redistribuí-las. Dessa forma, as varreduras a seco devem ser evitadas, por provocar aerossóis. Os utensílios empregados, como baldes, vassouras e panos de limpeza, devem ser desinfetados regularmente. A boa limpeza é um processo em etapas e também uma combinação de métodos que devem ser utilizados, dependendo do tipo de superfície a ser limpa. Limpar um ambiente no biotério é uma prática adotada no sentido de manter a saúde e a segurança dos homens e dos animais.

Higiene na Sala de Criação

Para que o trabalho não seja prejudicado na colônia, deve-se cuidar de todos os materiais que entrarão na sala de criação. A limpeza das gaiolas e das estantes geram aerossóis com alta quantidade de microorganismos; portanto, essa atividade deve ser realizada em áreas separadas das salas de criação. O microambiente do animal é de extrema importância, devendo-se promover a maior limpeza e higiene possível para que ele fique confortável nas gaiolas.

Importância de uma Boa Equipe

Requisitos Exigidos: indumentária e responsabilidade técnica

As atividades de um biotério, por serem bastante diferenciadas, exigem pessoal qualificado. Não basta, simplesmente, a pessoa gostar de animais para manuseá-los; é necessário que apresente determinadas condições, conforme o estabelecimento de rotinas, para a organização das tarefas de um biotério.

As responsabilidades técnicas devem ser bem especificadas e divididas por setores. Os programas de trabalho e distribuição das atividades devem ser fixados em locais visíveis e cada bioterista deve ter em seu poder uma cópia de suas atividades. A definição das rotinas pode ser diária, semanal ou mensal, devendo ser observadas as condições das instalações, dos equipamentos, da produção animal e do número de funcionários, que varia de acordo com a necessidade e o tamanho de cada colônia.

Na seleção de pessoal para trabalhar em biotérios, deverão ser realizados exames médicos. Pessoas com alergias (respiratórias e de contato), doenças de pele, ou doenças respiratórias crônicas deverão ser excluídas.

Devido aos estados fisiológicos e psicológicos dos animais de laboratório serem desconhecidos, o bioterista deverá tratá-los com respeito, proporcionando-lhes bem-estar e evitando o estresse, pois o seu comportamento poderá interferir nos resultados das pesquisas e nas aplicações biomédicas ou biotecnológicas.

Além dessas condições, é necessário que qualquer pessoa que trabalhe com animais tenha treinamento adequado, incluindo noções de biologia, comportamento animal, nutrição, reprodução e manejo das espécies.

Indumentária

Certas regras podem parecer excessivamente rígidas, porém são fundamentais na rotina dos biotérios. O funcionário, ao chegar ao seu local de trabalho, deve se dirigir ao vestiário, retirar toda sua roupa e se banhar abundantemente. O uso de jóias e bijuterias deve ser proibido no interior das salas de criação, visto que certos

materiais não suportam a desinfecção. Os objetos realmente necessários, como os óculos, devem ser borrifados com desinfetantes antes de entrarem na área limpa. O uniforme deve ser utilizado somente na área limpa, não devendo irritar e nem comprimir a pele. Além do uniforme, é necessário o uso de luvas, máscara e gorros (protetor para os cabelos). Após o término das atividades, ou na hora do almoço, o funcionário deverá retirar o uniforme.

Os cosméticos devem ter uso restrito, pois além de alojar microorganismos, o odor pode excitar e confundir o animal.

Responsabilidade Técnica

SETOR DE CRIAÇÃO

O responsável pela sala de criação tem como atividade principal o manejo dos animais. Suas atividades começam pelo controle dos padrões ambientais, temperatura, umidade relativa do ar e iluminação, que devem ser registrados diariamente em formulários próprios.

O número de trocas semanais das gaiolas dependerá do padrão sanitário da colônia, da quantidade de animais por gaiola e das trocas de ar da sala de criação. A rotina de limpeza se inicia pela retirada dos bebedouros, seguida pela troca das gaiolas, nas quais devem ser observados o número de animais e seu estado geral, bem como as condições de pelagem, presença de lesões, aspectos das fezes e comportamento em grupo. Os animais que apresentarem alterações devem ser separados e encaminhados ao setor de controle sanitário para a realização de exames laboratoriais. Após as trocas das gaiolas, devem ser registrados, na ficha de identificação, o número total de nascidos, de mortos e de desmamados.

Para sair da área, o responsável pela sala deve sempre utilizar a antecâmara (*air lock*) que o leva pelo corredor de acesso à área de lavagem. Sua circulação, quando dentro da área, deve obedecer a um único fluxo: banheiro, sala de animais, área de lavagem e banheiro.

SETOR DE DESINFECÇÃO E ESTERILIZAÇÃO

No setor de higienização e preparo de materiais, é processado todo o equipamento e material utilizado para a manutenção dos animais de área de criação. Na área de lavagem, as caixas são raspadas e os bebedouros esvaziados. Em seguida, as caixas são lavadas manualmente ou em máquinas apropriadas, devendo ficar imersas em tanques com solução desinfetante, ou autoclavadas. Os bicos dos bebedouros devem ficar imersos em água quente, sendo posteriormente lavados em equipamentos providos de jato de ar comprimido.

A maravalha, utilizada como cama do animal, deve ter boa procedência, ser isenta de pó ou eventuais pedaços de madeira. Deve ser observada a origem da madeira, visto que pode exalar odores ou pigmentos (cedro). A maravalha é acondicionada em sacos e esterilizada antes do uso.

SETOR DE CONTROLE SANITÁRIO

O controle sanitário é formado pelos laboratórios de microbiologia, genética e análises clínicas voltados ao diagnóstico e ao controle microbiológico das diversas espécies e linhagens mantidas na área de criação ou na área de isoladores.

Assim, no desenvolvimento das atividades de um biotério, é de fundamental importância a formação de equipes de trabalho. Todos têm papel importante e indispensável. A interação dessas equipes tem como objetivo a melhoria das condições de criação e manutenção dos animais, refletindo diretamente na quantidade e qualidade dos mesmos.

Bibliografia

De Luca, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. São Paulo: Winner Graph, 1996.

Fontelle, J. P. *Compêndio de Higiene*. Rio de Janeiro: Canton & Leite, 1932.

Sá, C. A. *Higiene e Educação da Saúde.* Rio de Janeiro: Impressora Brasileira, 1963.

Brasil. Ministério da Saúde. *Manual para Técnicos em Animais de Laboratório*. Rio de Janeiro: Departamento de Biotérios / BM / Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

Saúde do Trabalhador

Marcia Agostini

Introdução

Há muito tempo se sabe que o trabalho, quando executado sob determinadas condições, pode causar doenças, encurtar a vida, ou mesmo matar os trabalhadores. É histórico o nexo entre trabalho e saúde, enfocado desde Hipócrates (400 a.C.) até Ramazzihi (1633-1714), considerados, respectivamente, precursores da medicina e da medicina do trabalho.

Pensar o lado mais dramático da visão do trabalho leva-nos a pensar no mandato bíblico da mensagem "ganharás o pão com o suor do teu rosto". Esta expressão nos remete a uma compreensão do trabalho como esforço, risco e sofrimento psíquico. Contudo, devemos pensar o trabalho como uma atividade de transformação da natureza, empreendida socialmente pelos homens, não devendo denotar marca de sofrimento. Pelo contrário, dada a essencialidade do trabalho para a vida dos humanos e de toda a coletividade, sua realização deveria se efetivar nos mais altos imperativos éticos, tais como a participação e a solidariedade dos trabalhadores na sua execução e na divisão do valor e dos frutos desse trabalho no desenvolvimento da sociedade.

Ter saúde e bem-estar no trabalho é necessariamente compreender a noção de sujeito e ator de sua vida e de sua vida no trabalho, numa relação social de troca com os outros trabalhadores, numa busca constante de conhecimento e de luta contra os mecanismos de desvalorização e de precariedade do trabalho, o que implica um processo de construção e um avanço das condições de trabalho e da qualidade de vida e de saúde dos trabalhadores.

No entanto, a saúde do trabalhador se coloca dentro da área do conhecimento técnico-científico como um instrumento que possibilita o controle social do processo produtivo, tendo por base os critérios de saúde. Ao tentar analisar os problemas de saúde relacionados ao processo de trabalho, temos a compreensão da sua dimensão social e política, o que possibilita entender a saúde dos trabalhadores como a expressão de forças e de formas de organizações de um movimento histórico e dinâmico da classe trabalhadora.

Agentes de Risco Para a Saúde no Processo de Trabalho

Todo o processo de trabalho envolve situações de risco, de acidentes e de formas de adoecimento, segundo as condições de gênero e de qualidade de vida no trabalho. Os riscos no interior do processo de trabalho se concretizam nos chamados 'agentes de risco'.

O agente deve ser entendido, no sentido literal, como aquilo que pratica a ação, provocando a reação sobre o outro. No caso, um agente de risco atua direta ou indiretamente no corpo de trabalhador, sendo esse corpo entendido não somente no seu aspecto físico, mas sim de forma integral, incluindo as instâncias fisiológicas, psicológicas, emocionais etc.

A ação direta ocorre quando o próprio agente de risco entra em contato com o trabalhador, como no caso de substâncias químicas inaladas. Já a ação indireta ocorre quando o agente desencadeia transformações no ambiente e estas agem sobre o trabalhador. Esse é o caso das substâncias químicas inflamáveis que geram incêndios ou explosões.

O agente é uma característica do ambiente de trabalho e nele está presente. Ambiente, aqui, é utilizado referindo-se não somente ao ambiente físico, mas também à forma como esses fatores físicos são intermediados pelo trabalho, ou seja, inclui também as características de organização do trabalho.

Um agente de risco possui a probabilidade de, ao atuar sobre o trabalhador, prejudicar sua saúde. Para isso, ele deve concentrar características potencialmente danosas para a saúde. Por exemplo, ferramentas cortantes e engrenagens de máquinas são agentes de risco em potencial, pois, ao entrar em contato com o corpo humano, podem lesioná-lo de diversas formas. O mesmo podemos dizer de diversas substâncias químicas ou características físicas do ambiente como as temperaturas, vibrações e radiações presentes em um determinado processo de trabalho.

Cabe, aqui, fazer uma importante observação. Diversos agentes, adiante mencionados, estão presentes na natureza sem atuar de forma negativa sobre a saúde do homem. Quando vamos à praia, por exemplo, estamos sujeitos a elevadas temperaturas e às radiações ultravioleta e infravermelha. Contudo, ir à praia pode ser muito agradável e saudável. O que faz um agente ser de risco é a concentração e a forma de atuação sobre o homem. Se ir à praia deixa de ser um eventual prazer para se tornar obrigação diária, como no caso dos vendedores ambulantes, a radiação solar tropical pode vir a representar um agente de risco potencial causador, a curto ou longo prazo, de lesões e até mesmo de câncer de pele. Ou seja, a repetição da ação do agente, ao longo do tempo, pode fazer deste um risco para a saúde.

A Relação Entre Agentes de Risco e os Acidentes e Doenças do Trabalho

Muitas vezes os agentes de risco possuem baixos níveis de concentração, compelindo para que sejam imperceptíveis ou com que as pessoas se acostumem a eles. De uma forma ou de outra, tornam-se 'invisíveis' e posteriormente não são associados, nem pelo trabalhador nem pelos médicos, como responsáveis por determinados problemas de saúde. Além disso, ainda há muito a se conhecer sobre os efeitos danosos para a saúde de diversos agentes de risco que surgem e se expandem com o desenvolvimento tecnológico e industrial.

Essa última observação ressalta a importância de contextualizar os agentes de risco no interior dos processos de trabalho. Como o próprio nome revela, um processo de trabalho envolve todo um dinamismo associado às transformações sobre o objeto de trabalho. O trabalhador manipula e controla diversos instrumentos, realizando um conjunto de operações. Para analisarmos a presença e a forma de ação dos agentes de risco, precisamos atentar para as diversas fases e operações que caracterizam um processo de trabalho. Existem operações em que a possibilidade de atuação de certos agentes de risco é maior do que outras. Cabe às pessoas que estão levantando condições de trabalho delimitar essas situações, o que só é possível mediante a compreensão do processo de trabalho dentro de uma dimensão técnica.

Em outras palavras, só é possível percebermos a presença de agentes de risco se os analisarmos e contextualizarmos dentro do processo de trabalho, entendendo suas transformações, operações e a forma como os trabalhadores as realizam.

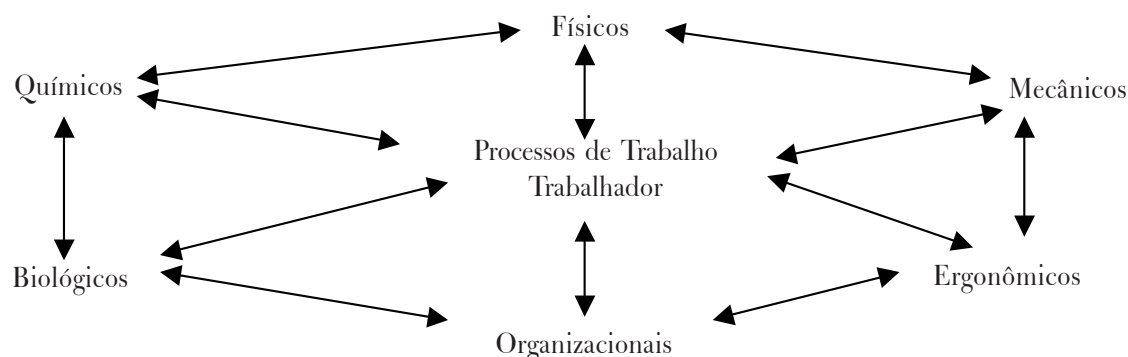
A Classificação dos Agentes de Risco

Antes de apresentar a classificação dos agentes, teceremos um rápido comentário sobre a ação simultânea de mais de um agente de risco no ambiente de trabalho.

Apesar da fragmentação realizada na classificação, consideramos ser de fundamental importância entender que raramente um agente de risco atua de forma dissociada ou desarticulada com outros agentes. Poucos estudos vêm sendo feitos levando em consideração essa realidade, porém podemos supor que a atuação conjunta de diversos agentes sobre o trabalhador forma efeitos distintos e em muitos casos mais funestos do que quando atuando isoladamente. Exemplificando: um trabalhador que simultaneamente respira em um ambiente tóxico, com um nível de ruído elevado e num sistema de organização altamente coercitivo, deve sofrer reações distintas do que se fosse afetado por esses mesmos agentes de forma isolada.

Sempre que possível, um levantamento de condições de trabalho e a sua análise deve se pautar na tentativa de articular a atuação dos diversos agentes em um dado ambiente de trabalho.

A seguir, apresentamos a classificação dos agentes de risco para a saúde, presentes nos processos de trabalho.

Figura 1 – Agentes de risco para a saúde presentes no processo de trabalho

Físicos

- ambiente térmico;
- ruído;
- radiações ionizantes;
- ambiente mal iluminado;
- pressões anormais;
- vibrações;
- eletricidade.

Químicos

- sólidos – poeiras, fumos;
- líquidos – vapores, gases;
- irritantes – asfixiantes;
- anestésicos – narcóticos;
- sistêmicos – carcinogênicos;
- inflamáveis – explosivos;
- corrosivos.

Ergonômicos

- postura (fadiga e problemas osteoarticulares);
- esforços físicos e mentais (fadiga).

Mecânicos

- quedas;
- lesões no manuseio de máquinas e instrumentos;
- rebarbas, cavacos, fagulhas;
- choque de veículos;
- outros impactos mecânicos.

Biológicos

- contato com animais peçonhentos (cobras, escorpiões, aranhas etc.);
- contato ou manuseio com microorganismos patogênicos (laboratórios, hospitais etc.);
- contato com vetores de doenças infecto-contagiosas.

Organizacionais

- trabalho em turnos alternados e noturnos;
- trabalho repetitivo e monótono;
- jornadas, pausas, horas extras;
- ritmo de trabalho, cobrança e produtividade;
- mecanismos de coerção e punição.

Pontos a Destacar

Alinhavando as questões fundamentais da relação trabalho e saúde, podemos caminhar na direção de um objetivo: o de trabalhar sem necessariamente adoecer ou morrer em decorrência do trabalho.

Com essa compreensão, uma heterogênea combinação de profissionais – filósofos, teólogos, cientistas sociais, políticos, planejadores, engenheiros, profissionais da saúde e outros, juntamente com os trabalhadores e suas organizações – já está engajada na transformação progressiva da organização do trabalho, das suas condições e de seus processos, bem como das respectivas tecnologias e do meio ambiente, na tentativa de resgate do sentido maior do trabalho: o trabalho sem sofrimento, dor, doença ou morte.

Para ampliar esse olhar sobre o trabalho e a saúde, estudiosos dessa área do conhecimento – o professor René Mendes, professor da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por exemplo – apontam como uma das expressões desse processo de mudança que vem ocorrendo nos últimos 20 anos, sobretudo no mundo ocidental, a compreensão da 'saúde do trabalhador' como um importante campo de estudos, cujas características básicas compreendem:

- a busca da compreensão das relações (do nexo) entre o trabalho e a saúde-doença dos trabalhadores, que se refletem sobre a atenção à saúde prestada;
- a possibilidade/necessidade de mudança dos processos – das condições e dos ambientes de trabalho – em direção à humanização do trabalho;

- o exercício de uma abordagem multidisciplinar e intersetorial das ações na perspectiva da totalidade, buscando a superação de atitudes improfícuas sobre a questão;
- a participação de trabalhadores, como sujeitos de sua vida e de sua saúde, capazes de contribuir, com seu conhecimento, para o avanço da compreensão do impacto do trabalho sobre o processo saúde-doença e de intervir politicamente para transformar essa realidade.

A 'saúde do trabalhador', como um processo em instituição, aparece sob práticas diferenciadas em diferentes momentos e regiões, dentro de um mesmo país, mantendo os mesmos princípios: trabalhadores buscam ser reconhecidos em seu saber, questionam as alterações nos processos de trabalho, particularmente a adoção de novas tecnologias, exercitam o direito à informação e à recusa ao trabalho perigoso ou arriscado à saúde, tendo como meta a 'humanização' do trabalho.

A emergência da 'saúde do trabalhador', em nosso país, deu-se a partir da década de 80 do século XX, no contexto da transição democrática e em sintonia com o que ocorreu no mundo ocidental.

Entre suas características básicas, destacam-se:

- um novo pensar sobre o processo saúde-doença e o papel exercido pelo trabalho na sua determinação;
- o desvelamento circunscrito, porém inquestionável, de um adoecer e morrer dos trabalhadores caracterizado por verdadeiras 'epidemias' tanto de doenças profissionais clássicas quanto de 'novas' doenças relacionadas ao trabalho;
- a denúncia das políticas públicas e do sistema de saúde, incapazes de dar respostas às necessidades de saúde da população e dos trabalhadores, em especial;
- novas práticas sindicais em saúde, traduzidas em reivindicações de melhores condições de trabalho, mediante a ampliação do debate, circulação de informações, inclusão de pautas específicas nas negociações coletivas, da reformulação do trabalho da Comissão Interna de Prevenção de Acidentes (Cipas) no âmbito da emergência do novo sindicalismo.

Esse processo social se desdobrou em uma série de iniciativas e se expressou nas discussões da VII Conferência Nacional de Saúde e na realização da I Conferência Nacional de Saúde dos Trabalhadores, sendo decisivo para a mudança de enfoque estabelecida na nova Constituição Federal de 1988.

Mais recentemente, a denominação 'saúde do trabalhador' aparece incorporada na nova Lei Orgânica da Saúde, que estabelece sua conceituação e define as competências do Sistema Único de Saúde (SUS) nesse campo.

Na implementação desse 'novo' modo de lidar com as questões de saúde relacionadas ao trabalho, em nosso país, foi fundamental o papel desempenhado pelas assessorias técnicas sindicais, estudando os ambientes e as condições de trabalho; levantando riscos e constatando danos para a saúde; decodificando o saber acumulado em processo contínuo de socialização da informação; resgatando e sistematizando, enfim, o saber operário vivenciado na relação educador-educando e tentando construir, ao longo da história, o valor do trabalho e de seus resultados como uma das formas de riqueza da vida humana.

Bibliografia

Agostini, M. et al. As múltiplas aproximações da relação "saúde, gênero e trabalho". *Revista do II Congresso Internacional Mulher, Trabalho e Saúde*, 1999.

Arendt, H. *A Condição Humana*. São Paulo: Forense Universitária, 1989.

Capistrano Filho, D. *Saúde do Trabalhador.* São Paulo: Hucitec, 1988.

Possas, C. *Saúde e Trabalho: a previdência social*. Rio de Janeiro: Graal, 1981.

45

Biossegurança em Biotérios

Antenor Andrade

Introdução

Ter segurança significa poder confiar. Assim, para se trabalhar com segurança e evitar acidentes, devem ser observadas e respeitadas as regras e os procedimentos de trabalho formulados para eliminar práticas perigosas e evitar riscos desnecessários.

Os animais de laboratório representam um risco para quem os maneja, pois, mesmo que não experimentalmente infectados, podem estar carreando agentes patogênicos, inclusive zoonóticos. Dessa forma, o risco de se adquirir infecções em biotérios nos quais as doenças infecciosas estão sendo estudadas, isto é, em infectórios, é muito grande.

Desse modo, um rígido controle nos protocolos experimentais deve ser associado a estritos procedimentos de segurança e não somente os técnicos devem ter consciência dos perigos existentes, alguns dos quais específicos para cada área, mas também os pesquisadores e o pessoal de apoio que têm acesso ao biotério.

Os estudos de longa duração em animais estão associados, freqüentemente, a estudos de carcinogênese, oncogênese viral, teratogênese, avaliação de compostos potencialmente tóxicos e radioisótopos, entre outros. Por esse motivo, a manipulação e administração de drogas, o contato com tecidos animais, inclusive soro, bem como alguns dos componentes das madeiras, cuja maravalha se usa para as 'camas' dos animais, constituem motivo de preocupação para aqueles que trabalham com animais de laboratório.

O Ambiente de Trabalho

Em biotérios, existe uma variedade muito grande de salas para animais, envolvendo salas para criação e produção, para manutenção, para cirurgias, quarentena ou ainda para manipulação de animais em experimentação, que podem estar expostos a materiais carcinogênicos, infecciosos ou alérgicos.

Alguns odores animais são agressivos para os seres humanos. Grande parte deles é produzida pela decomposição bacteriana dos excrementos, porém não se deve usar produtos que os mascarem, pois podem ser nocivos aos animais. Esses odores podem ser controlados por procedimentos de limpeza e ventilação adequados.

Quando se analisa o ambiente, deve-se testar tanto o macro quanto o microambiente (gaiolas dos animais), pois podem ser muito diferentes. O mais comum e mais sério dos contaminantes ambientais dos biotérios é o amoníaco (NH_3), que se forma pela ação das bactérias (urease positiva) sobre os excrementos. A concentração do amoníaco é influenciada por muitos fatores, como: ventilação, umidade relativa, desenho das gaiolas, número e sexo dos animais nas mesmas, estado sanitário dos animais, alimentação etc.

Nas salas de cirurgia e de inoculação de animais de laboratório é comum o uso de anestésicos voláteis; entre eles, o éter é o mais utilizado em nosso meio. Esse composto, além de produzir sintomas como dor de cabeça, cansaço e irritabilidade, pode apresentar peróxidos altamente explosivos que já foram responsáveis por graves acidentes nos laboratórios onde se realizavam experiências em animais. Para outros anestésicos voláteis também usados e que constituem riscos potenciais para a saúde, devem ser introduzidas medidas preventivas nas salas de cirurgia, para minimizar a exposição a esses tipos de anestésicos.

Normalmente, os técnicos são responsáveis por duas ou mais diferentes espécies animais e em alguns casos até por cães e primatas não-humanos. Dessa forma, o desempenho de qualquer atividade em um biotério pressupõe um treinamento específico, no qual o técnico será informado sobre todos os riscos a que está sujeito, bem como as maneiras de se proteger e evitá-los.

Os infectórios estão classificados em grupos de risco, segundo o tipo de atividade desenvolvida, no que se refere à biossegurança animal. Assim, definem-se as instalações e as práticas aplicáveis para trabalhar com animais infectados com agentes patogênicos, correspondentes aos níveis de biossegurança 1 a 4.

Quadro 1 – Níveis de biossegurança recomendados no uso de animais infectados

Nível de Biossegurança	Práticas e Técnicas	Equipamentos de Segurança	Instalações
1 Baixo risco – não causa doença ao homem ou ao animal.	Manejo-padrão para colônias convencionais.	———	Básicas
2 Moderado risco individual e comunitário – causa doença ao homem ou ao animal.	Uso obrigatório de jaleco e luvas; descontaminação dos dejetos infectados e das gaiolas dos animais antes da higienização; acesso limitado e sinalização para alerta de riscos.	Barreira parcial (guichê de desinfecção); uso de dispositivo de proteção para o pessoal (máscara, respiradouro etc.) para a manipulação de agentes ou animais infectados que produzem aerossóis.	Básicas
3 Elevado risco individual e baixo risco comunitário – causa doença grave ao homem ou ao animal.	Práticas do nível 2, mais uniforme especial e acesso controlado.	Os do nível 2, porém, devem ser usados para todos os tipos de manipulações com animais infectados.	Alta segurança
4 Elevado risco individual e comunitário – causa doença incurável ao homem ou ao animal.	Prática do nível 3 mais troca de roupa de rua por uniforme especial em vestiário; ducha na saída; descontaminação de todos os dejetos antes de sua retirada do infectório.	Barreiras máximas, isto é, nível 3 de segurança biológica ou barreira parcial em combinação com: proteção total do corpo com uma peça única dotada de ventilação e pressão positiva, gaiolas dotadas de filtros, estantes com fluxo laminar etc.	Segurança máxima

Proteção da Saúde

Como é do conhecimento de todos, doenças podem ser transmitidas do homem para os animais e vice-versa (zoonoses). Essa transmissão pode ser evitada por monitoramento cuidadoso da saúde dos animais e dos técnicos.

A higiene pessoal constitui uma importante barreira contra infecções. O hábito de lavar as mãos antes e após manipular qualquer animal reduz o risco de disseminar doenças, bem como o de auto-infecção. Para facilitar esses procedimentos, cada sala de animal deveria ser provida de uma pia, sabão e toalha de papel.

Fumar, comer ou beber não deve ser permitido em qualquer sala de animal ou em outra área em que existam microorganismos patogênicos ou que tenham sido manipulados recentemente. Da mesma forma, pessoas com ferimentos abertos não devem ter permissão para trabalhar onde haja a possibilidade de ter contato com microorganismos patogênicos, a não ser que os ferimentos possam ser satisfatoriamente protegidos.

As roupas de laboratório usadas em áreas de risco devem ser autoclavadas antes de serem lavadas. Sapatos descartáveis ou protetores de sapatos devem ser usados como barreira em áreas de alto risco e se houver necessidade de manipular material contaminado, deve-se usar luvas de borracha.

Animais experimentalmente infectados com microorganismos patogênicos são mais seguramente mantidos em gaiolas protegidas no fundo e dos lados, em vez de gaiolas de arame/tela. Essas gaiolas devem ser manuseadas adequadamente e os técnicos devem usar luvas protetoras, até mesmo quando fornecem alimentos a esses animais.

Se agentes altamente infecciosos ou nocivos são usados, o animal deve ser isolado em unidade de fluxo laminar ou mesmo em isoladores, nos quais o ar que entra e sai é convenientemente filtrado, por meio de filtros absolutos (filtro Hepa).

O manuseio de primatas não-humanos requer especiais precauções, além do uso de roupas protetoras apropriadas e materiais de uso específico para esses animais.

Necropsias de animais infectados com organismos altamente contagiosos devem ser feitas em gabinetes ventilados que ofereçam a devida segurança, isto é, que permitam a filtragem do ar.

O material de necropsia a ser descartado, deve ser lacrado em sacos plásticos, adequadamente identificado, autoclavado, se infeccioso, e incinerado. A sala de necropsia deve ser refrigerada adequadamente e possuir instalações para higienização (lavagem e desinfecção).

Zoonoses

As infecções transmitidas naturalmente entre animais vertebrados e o homem são denominadas zoonoses. Os animais devem ser considerados como transmissores potenciais, pois, embora não apresentem sinais aparentes de doença, podem carrear agentes causadores.

No entanto, o risco da ocorrência de zoonose varia muito em virtude da espécie animal envolvida. De todas as espécies utilizadas para fins experimentais, os primatas não-humanos constituem fontes mais perigosas de zoonose, não só por abrigarem uma grande gama de bactérias e vírus, mas também por serem uma espécie altamente susceptível a infecções comuns ao homem.

A transmissão de infecções do animal ao homem geralmente pode ser evitada por meio de cuidados veterinários adequados e do cumprimento de normas e procedimentos preestabelecidos na criação e experimentação animal.

Segurança Pessoal

Além dos perigos de doenças infecciosas transmissíveis dos animais para o homem, existem muitos riscos para o pessoal que trabalha em biotérios, incluindo danos causados por animais e produtos químicos, bem como materiais e equipamentos manuseados rotineiramente.

Como em outros laboratórios, os biotérios devem ter um programa de segurança que inclui equipamentos de combate a incêndio, instruções para o seu correto uso e treinamento de primeiros socorros.

Todas as pessoas que trabalham em biotérios devem estar familiarizadas com as exigências da instituição ou com o programa de segurança em casos de ferimento acidental.

Responsabilidades devem ser imputadas para assegurar que todo o pessoal que trabalha com animais aprenda como manipular corretamente as espécies envolvidas, para a segurança e saúde deles próprios, bem como dos animais.

Quando o trabalho envolve a manipulação de 'camas' contaminadas, o uso de aparelhagem portátil para a sua eliminação, equipada com fluxo de ar negativo ou a utilização de sistemas de vácuo, reduz a exposição dos técnicos durante a troca das gaiolas.

Enfim, todo trabalho com animais deveria se efetuar cumprindo as normas de 'boas práticas de laboratório', destinadas a salvaguardar os próprios animais, os resultados dos experimentos, as pessoas envolvidas e as instalações.

Traumas Físicos e Riscos por Substâncias Químicas

Os acidentes que geralmente ocorrem em biotérios estão incluídos em uma das cinco categorias a seguir:

- ferimentos causados por animais (arranhão, mordedura, coice etc.);
- cortes causados pelas gaiolas, tampas ou outros materiais;
- quedas causadas por pisos escorregadios ou degraus;
- torções causadas por objetos pesados, levantados incorretamente;
- ferimentos nos olhos e pele, quando da utilização incorreta de agentes químicos.

Todos eles podem ser prevenidos com total esclarecimento dos técnicos sobre o uso de roupas e equipamentos de proteção; a inspeção regular das gaiolas, tampas e demais materiais; a opção por pisos não escorregadios e a aquisição de escadinhas de altura adequada e degraus seguros para evitar que os técnicos utilizem objetos inadequados quando precisarem manusear as gaiolas do topo das prateleiras/estantes.

Material Radioativo

Os materiais radioativos apresentam riscos especiais e os técnicos que trabalham com esses materiais devem conhecer as propriedades de cada um e estar familiarizados com as técnicas de manuseio seguras e com as regulamentações de sua instituição. Não se deve esquecer, também, que os animais podem eliminar material radioativo em seus excrementos.

Os olhos e a pele são áreas críticas quando expostos à ação de raios ultravioleta, particularmente os olhos podem ser seriamente afetados. Dessa forma, se lâmpadas UV são usadas durante as tarefas, os técnicos devem usar roupas e óculos protetores. A intensidade máxima tolerada durante sete horas por dia é, em média, de 1,0 a 1,5 miliwatt por pé quadrado de área.

Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC) e de Proteção Individual (EPI)

Em virtude dos riscos a que estão sujeitas as pessoas que trabalham em biotérios, o uso de proteção coletiva e/ou individual adequada não pode ser descuidado, tendo em vista a variedade de ambientes de trabalho, as espécies animais envolvidas e a gama de agentes físicos, químicos e biológicos com que essas pessoas têm contato.

Principais EPC e EPI Utilizados em Biotérios

Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC)

CAPELAS DE FLUXO LAMINAR

- equipamentos de socorro imediato (chuveiro, lava-olhos, pia, sabão, escova etc.);
- exaustores;
- caixas com luvas;
- equipamentos portáteis de oxigênio;
- extintores de incêndio;
- condicionador de ar;
- desumidificador de ambiente;
- circulador de ar/ventilador;
- autoclave;
- microincinerador;
- barreiras (sanitária, acústica, térmica e radioativa);
- recipientes para rejeitos;
- recipientes especiais para transporte de material contaminado e/ou animais;
- pipetas mecânicas;
- dispositivos de segurança em máquinas e equipamentos.

Equipamentos de Proteção Individual (EPI)

- protetor ocular;
- protetor auricular;
- protetor facial;
- respiradores;
- máscaras;
- luvas;
- mangas;
- aventais;
- jaquetas;
- calçados.

Regras de Segurança de Caráter Geral

- conhecer o seu trabalho e os materiais que utiliza;
- conhecer todas as saídas de emergência;

- saber onde estão localizados os extintores e as mangueiras de incêndio, bem como saber utilizá-los;
- utilizar proteção apropriada;
- observar as indicações de não fumar em local não permitido;
- seguir todas as regras de segurança referentes ao seu trabalho;
- não operar, desmontar ou reparar equipamentos que não esteja qualificado a manusear;
- avisar imediatamente ao responsável qualquer situação de risco;
- conhecer as regras de primeiros socorros.

Regras de Segurança Ligadas Diretamente ao Trabalho

- não manusear espécie animal sem que esteja habilitado para tal;
- usar roupas e materiais de contenção de animais, conforme a espécie;
- informar imediatamente ao responsável as mordeduras, arranhões ou qualquer trauma físico que tenha sofrido;
- manter em ordem sua área de trabalho;
- não fumar, beber ou comer na área de materiais oriundos das criações;
- separar os materiais defeituosos ou em más condições, visando a sua recuperação;
- não colocar material que prejudique a visibilidade nos carros de transporte de materiais;
- manter as mãos limpas e as unhas aparadas;
- materiais de vidro, ao se quebrarem, devem ser recolhidos com pá e vassoura.

Conclusão

O trabalho com animais de laboratório requer a utilização e o contato com substâncias químicas e alérgenos potencialmente perigosos para a saúde do pessoal envolvido, as instalações e os próprios animais.

Esses perigos podem ser minimizados ou eliminados com o estrito cumprimento de procedimentos operacionais padronizados destinados a garantir a segurança. O estabelecimento e a validação desses procedimentos é uma responsabilidade intransferível da gerência do biotério ou laboratório, e estes devem ser escritos e explicados ao pessoal envolvido por meio de cursos e treinamento permanente.

Medidas preventivas devem ser tomadas já durante a elaboração do projeto de construção civil, especialmente com relação ao tipo de piso, tamanho das salas, localização de saídas de emergência e posição de extintores. Essas medidas devem possibilitar também o estabelecimento de uma ventilação unidirecional, evitando assim a disseminação dos contaminantes pelo ar turbulento. A recirculação do ar deve ser evitada, principalmente quando se trata de infectórios.

A seleção do pessoal para trabalhar em biotérios deve ser rigorosa. É obrigatória a realização de exame médico antes de assumir o emprego e deve-se excluir as pessoas com alergias respiratórias, ou de pele, ou com doenças respiratórias crônicas. Deve-se exigir também boa visão, olfato e audição satisfatórios, bem como um elevado padrão de higiene pessoal, permitindo assim trabalhar com segurança em biotérios ou laboratórios que utilizam animais.

Em alguns países, a ciência e a tecnologia em animais de laboratório infelizmente ainda não estão bem desenvolvidas; dessa forma, os procedimentos utilizados não correspondem nem às necessidades científicas, nem aos conceitos internacionalmente recomendados de segurança.

Bibliografia

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (CCAC). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.

CLOUGH, G. Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biol. Rev.*, p.487-523, 1982.

GAMBLE, M. R. & CLOUGH, G. Ammonia building in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium. *Laboratory Animal*, p.10-93, 1976.

GRIST, N. R. *Manual de Biossegurança para o Laboratório*. São Paulo: Livraria Santos Ed., 1995.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). *Biosafety Awareness – Occupational safety and health branch. NIH Manual*. Washington, D.C.: National Institutes of Health, Division of Safety, 1987.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.

PHILIPS, G. B. & JEMISKI, J. V. Biological Safety in the Animal House. *Laboratory Animal Care*, 13:13, 1963.

SAIZ MORENO, L; GARCIA DE OSMA, J. L. & COMPAIRE FERNANDEZ, C. *Animales de Laboratorio: producción, manejo y control sanitario*. Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrárias. Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1983.

SEAMER, J. H. & WOOD, M. *Safety in the Animal House*. 2nd revised edition. In: ___. SEAMER, J. H. & WOOD, M. (Eds.). London: Laboratory Animal Ltda., 1981.